

**Charakterisierung der zellassozierten
Phospholipase A PlaB aus *Legionella pneumophila*, das
erste beschriebene Mitglied einer neuen Lipasefamilie**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades
einer Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Katja Kuhle
aus Halle (Saale)

1. Referentin: Professorin Dr. Antje Flieger
2. Referent: Professor Dr. Michael Steinert
eingereicht am: 23.06.2014
mündliche Prüfung (Disputation) am: 25.09.2014

Druckjahr 2014

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch die Mentorin der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Kuhle, K. & Flieger, A. (2014). *Legionella* Phospholipases Implicated in Virulence. In *Molecular Mechanisms in Legionella Pathogenesis* (pp. 175-209). Springer Berlin, Heidelberg.

Kuhle, K., Krausze, J., Curth, U., Rössle, M., Heuner, K., Lang, C. & Flieger A. (2014): „Oligomerization inhibits *Legionella pneumophila* PlaB phospholipase A activity“. *Journal of Biological Chemistry*. 2014 May 8. pii: jbc.M114.573196.

Tagungsbeiträge

Katja Kuhle, Jennifer Bender, Antje Flieger: „Characterization of the major cell-associated phospholipase A PlaB of *Legionella pneumophila*, the first member of a novel phospholipase family“. (Poster) MPP027. Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM). Karlsruhe (2011).

Katja Kuhle, Jennifer Bender, Klaus Heuner, Antje Flieger: „Characterization of the C-terminal half of major cell-associated phospholipase A PlaB of *Legionella pneumophila*“. (Poster) MPP063. Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM). Tübingen (2012).

Katja Kuhle, Jennifer Bender, Klaus Heuner, Antje Flieger: „Importance of the C-terminal half of cell-associated phospholipase A PlaB for secretion and localisation in *Legionella pneumophila*“. (Poster) MMAP033. Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM). Bremen (2013).

Katja Kuhle, Joern Krausse, Ute Curth, Manfred Rössle, Christina Lang, Antje Flieger: „Surface-exposed phospholipase A PlaB assembles in tetramers, contains activity-promoting C-terminal amino acids and promotes intracellular replication of *Legionella pneumophila*“. (Poster). Die 8. Internationale *Legionella*-Konferenz. Melbourne, Australien (2013).

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	III
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VII
TABELLENVERZEICHNIS	IX
ABBKÜRZUNGSVERZEICHNIS	X
ZUSAMMENFASSUNG	XIII
1 EINLEITUNG	1
1.1 <i>Legionella pneumophila</i> – ein Krankheitserreger der Lunge	2
1.1.1 Mikrobiologie, Ökologie und Lebenszyklus des Lungenerregers	2
1.1.2 Legionellosen – Krankheitsbild und Therapie	5
1.2 Virulenzfaktoren von <i>L. pneumophila</i>	7
1.3 Sekretionssysteme von <i>L. pneumophila</i>	8
1.4 Bakterielle Phospholipasen als Virulenzfaktoren	10
1.4.1 Die Klassifizierung und Eigenschaften von Phospholipasen	11
1.4.2 Rolle der bakteriellen Phospholipasen in der Virulenz	14
1.5 Die Vielfalt der Phospholipasen in <i>L. pneumophila</i>	17
1.5.1 Phospholipasen A der GDSL-Hydrolasen, PlaB- und PLP-Familie	18
1.5.2 Bedeutung der Phospholipasen A für <i>L. pneumophila</i>	21
1.6 Zielstellung	23
2 MATERIAL UND METHODEN	25
2.1 Material	25
2.1.1 Software	25
2.1.2 Technische Laborausstattung	25
2.1.3 Spezielle Materialien	26
2.1.4 Chemikalien	27
2.1.5 Puffer und Lösungen	28
2.1.6 Kommerzielle Kits	30
2.1.7 Lipide	30
2.1.8 Standards, Enzyme und Antikörper	30
2.1.9 Oligonukleotide und Plasmide	31
2.1.10 Bakterienstämme	35

2.1.11 Nährmedien für Bakterien	40
2.2 Methoden	41
2.2.1 Kultivierung von Bakterien	41
2.2.1.1 <i>Escherichia coli</i>	41
2.2.1.2 <i>Legionella pneumophila</i>	41
2.2.1.3 Herstellung von Glyzerinkryokulturen	42
2.2.2 Herstellung und Transformation kompetenter Zellen	42
2.2.2.1 Herstellung und Transformation elektrokompeter <i>L. pneumophila</i> Zellen	42
2.2.2.2 Herstellung und Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	42
2.2.3 Nukleinsäure-Techniken	43
2.2.3.1 Isolierung extrachromosomaler DNA	43
2.2.3.2 Nukleinsäureverdau mittels Restriktionsendonukleasen	43
2.2.3.3 Dephosphorylierung von Plasmiden	43
2.2.3.4 Ligation von DNA-Fragmenten	43
2.2.3.5 Fällung von Nukleinsäuren	44
2.2.3.6 Nukleinsäure-Gelelektrophorese	44
2.2.3.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	44
2.2.3.8 Einführen von Punktmutationen in Plasmid-DNA	46
2.2.3.9 Zufällige Mutagenese mittels <i>error-prone</i> PCR	47
2.2.3.10 Sequenzierungs-Polymerase-Kettenreaktion	48
2.2.4 Proteinanalytik	48
2.2.4.1 Proteinfällung mittels Trichloressigsäure (TCA)	48
2.2.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration	49
2.2.4.3 Eindimensionale (1D)- SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	49
2.2.4.4 Coomassie-Färbung von Polyacrylamidgelen	49
2.2.4.5 Western Blot, Immundetektion und Nachweis mittels Ponceau	49
2.2.4.6 Identifizierung von Proteinbanden mittels Massenspektrometrie	50
2.2.4.7 N-Terminale Sequenzierung	51
2.2.4.8 Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie	51
2.2.5 Expression und Reinigung von Proteinen	51
2.2.5.1 Proteinexpression in <i>E. coli</i> BL21 und <i>L. pneumophila</i> <i>plaB1</i>	51
2.2.5.2 Reinigung mittels Affinitätschromatographie	52
2.2.5.3 Reinigung mittels Anionenaustauschchromatographie (AEC)	53
2.2.5.4 Reinigung mittels Größenausschlusschromatographie (SEC)	54
2.2.6 Herstellung und Präadsorption polyklonaler Antikörper	54
2.2.7 Analytische Ultrazentrifugation (AUZ)	55

2.2.8	Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS)	56
2.2.9	Quervernetzung von gereinigten Proteinen (<i>Crosslinking</i>)	57
2.2.10	Nachweis von Phospholipaseaktivität	57
2.2.11	Analyse polarer Lipide und Fettsäuren aus <i>L. pneumophila</i>	58
2.2.11.1	Analyse polarer Lipide	58
2.2.11.2	Analyse zellulärer Fettsäuren	59
2.2.12	Proteinase K-Verdau	59
2.2.13	Fraktionierung Gram-negativer Bakterienzellen	60
2.2.14	Biotinylierung zelloberflächenassoziiierter Proteine	60
3	ERGEBNISSE	62
3.1	Biochemische Analyse der Phospholipase A PlaB	62
3.1.1	<i>In silico</i> Analyse von PlaB	62
3.1.2	Untersuchungen zur enzymatischen Aktivität verschiedener PlaB-Mutanten	63
3.1.2.1	Bedeutung des C-Terminus für die enzymatische Aktivität von PlaB	64
3.1.2.2	Identifizierung weiterer relevanter Aminosäuren für die enzymatische Aktivität von PlaB	68
3.1.3	Strategien zur Expression und Reinigung von PlaB	71
3.1.3.1	Koexpression von GST-fusioniertem PlaB mit Chaperonen	71
3.1.3.2	Expression und Reinigung von PlaB mit MBP-Fusion	73
3.1.3.3	Expression und Reinigung von PlaB mit Strep-Fusion	76
3.1.3.4	Gewinnung eines polyklonalen Antikörpers gegen PlaB	77
3.2	Strukturelle Charakterisierung von PlaB	79
3.2.1	Untersuchungen zum Oligomerisierungsgrad von PlaB	79
3.2.1.1	Homodimerisierung	79
3.2.1.2	Homotetramerisierung	81
3.2.2	Berechnung eines SAXS-Modells von PlaB	84
3.2.3	Einfluss der letzten 15 Aminosäuren auf den Oligomerisierungsgrad von PlaB	86
3.2.4	Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität vom Oligomerisierungsgrad	87
3.3	Expressionsprofil mit dazugehörigen lipolytischen Aktivitäten von PlaB	91
3.4	Untersuchungen zur Lokalisation von PlaB	94
3.5	Untersuchungen zur Sekretion von PlaB	99
3.5.1	Analyse verschiedener Sekretionsmutanten von <i>L. pneumophila</i>	99
3.5.2	Sekretionsanalysen N- und C-terminal verkürzter Varianten von PlaB	101
3.5.3	N-terminale Sequenzierung von PlaB	105

3.6 Funktionelle Analyse von PlaB - Zusammensetzung der Membranlipide in <i>L. pneumophila</i>	106
4 DISKUSSION	110
4.1 PlaB in Reinform – ein wichtiger Schritt für weitere Charakterisierungen	110
4.2 Identifizierung wichtiger Aminosäuren für die enzymatische Aktivität von PlaB	113
4.2.1 Bedeutung der letzten 15 Aminosäuren für enzymatischen Aktivität von PlaB	113
4.2.2 Identifizierung weiterer für die PlaB-Aktivität wichtige Aminosäuren	115
4.3 Der Einfluss oligomerer Zustände von PlaB auf die enzymatische Aktivität	117
4.4 Subzelluläre Lokalisation und Export des PlaB-Proteins	121
4.4.1 PlaB – ein peripheres Protein der äußeren Membran	121
4.4.2 PlaB-Export zur Bakterienoberfläche	123
4.5 Bedeutung von PlaB für das Bakterium	126
4.5.1 Einfluss von PlaB auf Membranzusammensetzung von <i>L. pneumophila</i>	126
4.5.2 Modellvorstellung zur Aktivität von PlaB in <i>L. pneumophila</i>	127
ANHANG	130
LITERATURVERZEICHNIS	132
DANKSAGUNG	155
LEBENS LAUF	156

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Der Lebenszyklus von <i>L. pneumophila</i>	4
Abb. 1.2: Die Darstellung der enzymatischen Spaltung von Phospholipiden am Bsp. von Phosphatidylcholin mittels verschiedener Phospholipasen und der entstehenden Reaktionsprodukte.....	12
Abb. 1.3: Überblick über den möglichen Einfluss bakterieller Phospholipasen auf die Wirtszelle.	15
Abb. 1.4: Überblick der <i>L. pneumophila</i> Phospholipasen einschließlich der bekannten Sekretionswege.....	17
Abb. 3.1: Schematische Darstellung von PlaB mit bekannten Regionen und Bereichen.	63
Abb. 3.2: Lipidhydrolyse des getrennt exprimierten N- und C-terminalen Bereiches von PlaB. ..	64
Abb. 3.3: Die letzten 15 Aminosäuren sind essentiell für die enzymatische Aktivität von PlaB. .	66
Abb. 3.4: Lipidhydrolyse der Alanin-Mutagenese-Mutanten von His-PlaB.....	67
Abb. 3.5: Zufallsmutagenese mittels <i>error-prone</i> PCR zeigte Mutanten mit reduzierter enzymatischer Aktivität von PlaB.	69
Abb. 3.6: Koexpression von GST-PlaB mit den zwei Chaperonkomplexen DnaK-DnaJ-GrpE und GroEL-GroES bei 37 °C für 3 h.....	72
Abb. 3.7: Affinitätschromatographische Reinigung von MBP-PlaB mit anschließendem Enterokinase-Verdau.	74
Abb. 3.8: Faktor Xa-Verdau von MBP-PlaB mit anschließender Anionenaustauschchromatographie.....	75
Abb. 3.9: Affinitätschromatographische Reinigung von Strep-PlaB.	77
Abb. 3.10: Western Blot Analyse zur Überprüfung des α -PlaB Antiserums.	78
Abb. 3.11: Analyse mittels Größenausschlusschromatographie (SEC) zur Ermittlung des Oligomerisierungsgrades von PlaB.	80
Abb. 3.12: Quervernetzungsanalyse mit Paraformaldehyd (PFA) zur Ermittlung des Oligomerisierungsgrades von PlaB.	81
Abb. 3.13: Massenspektrum der MALDI-TOF Analyse von PlaB-Strep.	82
Abb. 3.14: Analytische Ultrazentrifugation zur Validierung des Oligomerisierungsgrades von PlaB.	83
Abb. 3.15: SAXS-Modell von PlaB.	85
Abb. 3.16: Untersuchungen der C-terminal verkürzten Varianten von Strep-PlaB mittels SEC und SAXS.	87
Abb. 3.17: Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität von der Strep-PlaB Proteinkonzentration.	88

Abb. 3.18: Analytische Ultrazentrifugation (AUZ) zur Bestimmung der Oligomerisierungszustände im nanomolaren Konzentrationsbereich von PlaB.	90
Abb. 3.19: Präsenz von PlaB während des Wachstums von <i>L. pneumophila</i> Corby Wildtyp.	92
Abb. 3.20: Konzentrationsbestimmung von PlaB pro <i>Legionella</i> -Zelle.	93
Abb. 3.21: Lokalisationsanalyse von PlaB mittels Ultrazentrifugation.	95
Abb. 3.22: Lokalisationsanalyse von PlaB mittels Biotinylierung oberflächenassoziierter Proteine.	96
Abb. 3.23: Lokalisationsanalyse von PlaB mittels Proteinase K-Degradation.	98
Abb. 3.24: Sekretionsanalyse von PlaB mittels Proteinase K-Degradation bei verschiedenen Sekretionsmutanten.	99
Abb. 3.25: Analyse des Zelllysates der <i>lspDE</i> (T2SS) Sekretionsmutante mittels α -PlaB Western Blot und Dünnschichtchromatographie.	100
Abb. 3.26: Schematische Übersicht der untersuchten N- und C-terminal verkürzten PlaB-Varianten in Hinblick auf Sekretion.	102
Abb. 3.27: Untersuchung zur Sekretion von PlaB mittels einfacher Fraktionierung N- und C-terminal verkürzter PlaB-Varianten in <i>L. pneumophila</i> Corby <i>plaB1</i>	103
Abb. 3.28: Untersuchung zur Sekretion von PlaB mittels Proteinase K-Degradation N- und C-terminal verkürzter PlaB-Varianten in <i>L. pneumophila</i> Corby <i>plaB1</i>	104
Abb. 3.29: Analyse der ersten 20 Aminosäuren von PlaB mittels Edman-Abbau.	106
Abb. 3.30: Vergleichende Analyse der polaren Lipide mittels Dünnschichtchromatographie (DC) zwischen <i>L. pneumophila</i> Wildtyp und <i>plaB</i> -Mutante unterschiedlicher Wachstumsphasen.	107
Abb. 4.1: PlaB-Kristalle.	115
Abb. 4.2: Schematische Darstellung des Einflusses der Proteinkonzentration auf den Oligomerisierungsgrad und die damit verbundene enzymatische Aktivität von PlaB.	120
Abb. 4.3: Modellvorstellung über den Wirkmechanismus von PlaB in <i>L. pneumophila</i>	128

Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1: Übersicht über die zwei verschiedenen Formen einer Legionellen-Infektion.	6
Tab. 2.1: verwendete Software und Internetdatenbanken	25
Tab. 2.2: verwendete Geräte.....	25
Tab. 2.3: verwendete Materialien.....	26
Tab. 2.4: verwendete Chemikalien.....	27
Tab. 2.5: verwendete Lösungen und Puffer.....	28
Tab. 2.6: verwendete Kits.....	30
Tab. 2.7: verwendete Lipidsubstrate	30
Tab. 2.8: verwendete Standards für Elektrophoresen.....	30
Tab. 2.9: verwendete Enzyme	30
Tab. 2.10: verwendete Antikörper.....	31
Tab. 2.11: verwendete Oligonukleotide	31
Tab. 2.12: verwendete Plasmide.....	33
Tab. 2.13: verwendete Bakterienstämme	35
Tab. 2.14 verwendete und erzeugte gentechnisch veränderte Organismen.....	35
Tab. 2.15: Auflistung der aus der <i>error-prone</i> PCR-Klonbank isolierten DH5 α -Mutanten	39
Tab. 2.16: verwendete Nährmedien zur Anzucht von <i>E. coli</i>	40
Tab. 2.17: verwendete Nährmedien zur Anzucht von <i>L. pneumophila</i>	40
Tab. 2.18: verwendete Antibiotika mit Endkonzentration im Medium.....	41
Tab. 2.19: Reaktionsansatz einer Standard- bzw. Kolonie-PCR.....	45
Tab. 2.20: Reaktionsansatz zur Amplifizierung von Plasmiden	45
Tab. 2.21: Standard-PCR-Programm	46
Tab. 2.22: Reaktionsansatz für <i>QuikChange Site-Directed Mutagenesis</i>	46
Tab. 2.23: PCR-Programm für <i>QuikChange Site-Directed Mutagenesis</i>	46
Tab. 2.24: Reaktionsansatz für <i>error-prone</i> Mutagenese.....	47
Tab. 2.25: PCR-Programm für <i>error-prone</i> Mutagenese.....	47
Tab. 2.26: Reaktionsansatz für Sequenzierung	48
Tab. 2.27: PCR-Programm für Sequenzierung.....	48
Tab. 2.28: zur Expression verwendete Induktoren und Expressionsbedingungen	52
Tab. 2.29: Übersicht der verwendeten Proteasen zur Abspaltung des MBP-Tags.....	53
Tab. 3.1: Übersicht über Mutanten der Zufallsmutagenese mit einer <i>missense</i> Punktmutation	70
Tab. 3.2: Relative Mengen der zellulären Fettsäuren von <i>L. pneumophila</i> Corby Wildtyp (WT) und <i>plaB</i> -Mutante (<i>plaB1</i>).....	108

Abbkürzungsverzeichnis

% (v/v)	Volumenprozent pro Volumen
% (w/v)	Gewichtsprozent pro Volumen
1,2-DG	1,2-Diacylglycerol
3D	dreidimensional
Abb.	Abbildung
AEC	<i>anion exchange chromatography</i> , Anionenaustauschchromatographie
Amp	Ampicillin
AP	Antarctic Phosphatase
AS (aa)	Aminosäure (<i>amino acid</i>)
AUZ	analytische Ultrazentrifugation
BCYE	<i>Buffered Charcoal Yeast Extract</i>
BSA	Rinderserumalbumin
BYE	<i>Buffered Yeast Extract</i>
bzw.	beziehungsweise
C12-PN	n-Dodecylphosphocholin
ca.	<i>circa</i>
CD	Circulardichroismus
CFU	kolonieformende Einheit
Cm	Chloramphenicol
CL	Cardiolipin
c(s)	Sedimentationskoeffizient
Da/ kDa	Dalton/ kilo-Dalton
DC	Dünnschichtchromatographie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	endoplasmatischen Retikulums
et al.	<i>et alii</i> , und andere
EtOH	Ethanol
FA	Formaldehyd
FCS	Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie
FFA	<i>free fatty acids</i> , freie Fettsäuren
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>

GCAT	Glycerophospholipid:Cholesterol-Acyltransferase
GST	Glutathion-S-transferase
h	Stunde
H ₂ O _{bidest}	bidestilliertes Wasser
HRP	Meerrettich-Peroxidase-Konjugat
IM	<i>inner membrane fraction</i> , innere Membranfraktion
Kan	Kanamycin
LB	Luria-Bertani
LCV	<i>Legionella containing vacuole</i>
LPA	Lysophosphatidsäure
LPS	Lipopolysaccharide
LPC	Lysophosphatidylcholin
LPG	Lysophosphatidylglyzerol
<i>L. pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i>
MALDI-TOF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation – Time Of Flight</i>
MBP	Maltose-Bindeprotein
MG	Molekulargewicht
MIF	<i>mature intracellular form</i>
min	Minute
Mip	<i>macrophage infectivity potentiator</i>
MOMP	<i>major outer membrane protein</i>
O ²⁻	Superoxid-Anion
OM	<i>outer membrane fraction</i> , äußere Membranfraktion
OMPLA	<i>outer membrane phospholipase A</i>
ppGpp	Guanosin-3',5'-bispyrophosphat
PA	Phosphatidsäure
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PC	Phosphatidylcholin
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phosphatidylethanolamin
PFA	Paraformaldehyd
PG	Phosphatidylglyzerol
PHB	Polyhydroxybutyrat
PI	Phosphatidylinositol
pI	isoelektrischer Punkt

PKC	Proteinkinase C
PLA	Phospholipase A
PLB	Phospholipase B
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
PLP	<i>patatin-like protein</i> , Patatin-ähnliches Protein
PMSF	Phenylmethanesulfonylfluorid
PNP	Purin-Nukleosid-Phosphorylase
PS	Phosphatidylserin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
R _G	Gyrationsradius
rpm	<i>revolutions per minute</i> , Umdrehung pro Minute
s.	siehe
SAXS	<i>small angle X-ray scattering</i> , Röntgenkleinwinkelstreuung
SCV	<i>Salmonella containing vacuole</i> , <i>Salmonella</i> -beinhaltende Vakuole
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
SE	<i>Sedimentation equilibrium</i> , Sedimentations-Diffusions-Gleichgewichtszentrifugation
SEC	<i>size exclusion chromatography</i> , Größenausschlusschromatographie
sek	Sekunde
Sif	<i>Salmonella</i> -induzierte Filamente
SM	Sphingomyelin
SOC	Derivat von <i>Super Optimal Broth</i>
SV	<i>Sedimentation velocity</i> , Sedimentations-Geschwindigkeitszentrifugation
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBST	<i>Tris Buffered Saline with Tween 20</i>
TCA	Trichloressigsäure
T _m	Schmelztemperatur
U	Units
UV	Ultraviolett
VBNC	<i>viable but non cultureable</i>
VPS	<i>vacuole protein sorting</i> , vakuolären Proteinsortierung
WT	Wildtyp
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
z.B.	zum Beispiel

Zusammenfassung

Der intrazellulär replizierende Erreger der Legionärskrankheit, *Legionella pneumophila*, exprimiert eine außerordentliche Vielfalt an Phospholipasen, wobei die 15 verschiedenen Phospholipasen A den größten Anteil ausmachen. Neben den sekretierten Proteinen, welche zum Teil über das Typ IVB- und das Typ II-Sekretionssystem transloziert werden, existiert eine besonders aktive zellassoziierte Phospholipase A, namens PlaB. Diesem ersten charakterisierten Mitglied einer neuen Lipasefamilie, welches sowohl hämolytische als auch Phospholipase A/Lysophospholipase A-Aktivitäten aufweist, wird eine wichtige Rolle als Virulenzfaktor zugeschrieben. Das für die enzymatische Aktivität wichtige katalytisch aktive Zentrum bestehend aus Ser-Asp-His konnte in der N-terminalen Hälfte des Proteins identifiziert werden. Der C-terminalen Hälfte von etwa 170 Aminosäuren wurde bisher noch keine Funktion zugeordnet. Es ist jedoch bekannt, dass bereits das Fehlen der letzten 15 Aminosäuren zum Verlust der enzymatischen Aktivität von PlaB führt.

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Bedeutung des C-Terminus für die enzymatische Aktivität von PlaB zu analysieren, PlaB in reiner und aktiver Form für strukturelle Analysen und für die Generierung eines PlaB-spezifischen Antikörpers zu gewinnen sowie Expressions-, Lokalisations- und Exportanalysen von PlaB in *L. pneumophila* durchzuführen.

Die Bedeutung des C-Terminus, vor allem der letzten 15 Aminosäuren, für die enzymatische Aktivität wurde mittels Mutagenese-Studien analysiert. Es zeigte sich, dass jede einzelne polare Aminosäure innerhalb der letzten 15 Aminosäuren zur enzymatischen Aktivität von PlaB beiträgt. Mittels Zufallsmutagene konnten zudem 22 neue Aminosäuren identifiziert werden, deren Mutation einen Einfluss auf die Phospholipase A-Aktivität von PlaB bewirkt.

Des Weiteren wurde lösliches und aktives PlaB zum ersten Mal in ausreichenden Mengen und in reiner Form mittels einer N-terminalen Strep-Fusion gewonnen. Dies ermöglichte die Generierung eines funktionellen PlaB-spezifischen Antikörpers sowie die weitere biochemische und strukturelle Charakterisierung des Enzyms. Die strukturellen Analysen des gereinigten Strep-PlaB mittels Röntgenkleinwinkelstreuung, Größenausschlusschromatographie, chemischer Quervernetzung, Massenspektrometrie und der analytischen Ultrazentrifugation ergaben, dass PlaB ein konzentrationsabhängiges Monomer-Dimer-Tetramer-Gleichgewicht ausbildet. Obwohl die letzten 15 Aminosäuren zur PlaB-Aktivität beitragen, spielen sie keine essentielle Rolle für die Ausbildung des Tetramers. Interessanterweise zeigte PlaB im nanomolaren Konzentrationsbereich, in welchem das Enzym als Monomer vorliegt, die stärkste spezifische Aktivität. Oberhalb von $\sim 0,1 \mu\text{M}$, wo PlaB als Dimer-Tetramer-Gleichgewicht existiert, war jedoch ein Rückgang der Aktivität zu beobachten. Bei Proteinkonzentrationen $> 5,4 \mu\text{M}$, wo PlaB als Tetramer vorliegt, wurde keinerlei Aktivität festgestellt. Demnach ergibt sich folgendes

Modell, in dem PlaB bei hohen Proteinkonzentrationen zu einer inaktiven Enzymform, dem Tetramer, assembliert. Bei niedriger Proteinkonzentration hingegen dissoziiert der Komplex bis hin zum Monomer, was wiederum zur Aktivierung von PlaB führt.

Der funktionelle α -PlaB Antikörper ermöglichte zudem Expressions-, Lokalisations- und Exportanalysen in *L. pneumophila*. Dabei ergaben die zelluläre Fraktionierung sowie die Biotinylierung oberflächenassoziiierter Proteine und die Analyse der Proteinase K-Zugänglichkeit, dass PlaB als oberflächenassoziiertes Protein auf der äußeren Membran lokalisiert ist. Allerdings konnte das verantwortliche Sekretionssystem für den Export noch nicht identifiziert werden. Sekretionsmutanten vom Typ I, Typ II, Typ IVA, Typ IVB und Tat zeigten keine Einschränkung in der Oberflächenassoziation von PlaB. Jedoch gaben Sekretionsstudien mit N- und C-terminal verkürzten PlaB-Mutanten Hinweise auf für die Translokation wichtige Proteinregionen.

Die sehr aktive zelloberflächenassoziierte Phospholipase A, PlaB, die in höchster Konzentration während der stationären Phase detektiert wurde, repräsentiert somit das erste bekannte Beispiel für die konzentrationsabhängige Inaktivierung der PLA-Aktivität durch Tetramerisierung. Dieser Mechanismus dient möglicherweise dem Selbstschutz von *Legionella*. Als Virulenzfaktor beeinflusst PlaB jedoch nicht die Zusammensetzung der bakteriellen Membran von *L. pneumophila* zur Anpassung an spezifische Wachstumsphasen, sondern scheint eher ihre Aktivitäten gegen den Wirt zu richten, was vorhergehende *in vivo* Infektionsexperimente verdeutlichten.

1 Einleitung

Die Gattung *Legionella* aus der Familie der *Legionellaceae*, die vor über 35 Jahren entdeckt wurde, gehört zu der Klasse der γ -Proteobakterien (Diederer, 2008). Die Anzahl an bekannten Spezies mit den dazugehörigen Serogruppen dieser Gattung steigt seit dieser Zeit unaufhörlich an. Derzeit sind 57 verschiedene Spezies mit mindestens 73 Serogruppen beschrieben worden (Lück *et al.*, 2010, Pearce *et al.*, 2012, Yang *et al.*, 2012, Campocasso *et al.*, 2012) (<http://www.bacterio.cict.fr/l/legionella.html>; <http://www.dsmz.de>). Davon werden 26 Spezies als humanpathogen angesehen und 11 weitere Spezies über die Serologie mit Erkrankungen in Verbindung gebracht (Newton *et al.*, 2010, Yang *et al.*, 2012). Mehr als 90% der humanen Infektionen werden durch die Spezies *Legionella pneumophila* verursacht, wobei *L. pneumophila* der Serogruppe 1 für mehr als 84% der weltweit auftretenden und 95% der europäischen Fälle verantwortlich ist (Fields *et al.*, 2002, Harrison *et al.*, 2007, Victor *et al.*, 2002, Newton *et al.*, 2010). Insgesamt sind mindestens 16 Serogruppen für die Spezies *L. pneumophila* bekannt, von denen die Serogruppen 2, 4 und 6 ebenfalls mit *Legionella*-Infektionen assoziiert werden (Winn Jr & Myerowitz, 1981, Benson & Fields, 1998, Muder & Victor, 2002, Diederer, 2008). Daneben können die non-*pneumophila* Spezies *L. micdadei*, *L. bozemanii*, *L. longbeachae* und *L. jordanis* ebenfalls als Krankheitserreger in Erscheinung treten (Lück, 2011). Der in dieser Arbeit überwiegend verwendete *L. pneumophila* Corby Stamm, dessen Genom vollständig sequenziert vorliegt, gehört zu der als hoch virulent anzusehenden Serogruppe 1 (Glöckner *et al.*, 2008, Jepras *et al.*, 1985). Interessanterweise wurde die Spezies *L. pneumophila* erstmals 1976 nach einem Ausbruch einer lebensbedrohlichen Pneumonie mit 182 Betroffenen während eines Treffens von US-Kriegsveteranen in Philadelphia beschrieben. Insgesamt mussten 147 Teilnehmer hospitalisiert werden, von denen 29 starben. In Anlehnung an diesen Ausbruch wurde die Erkrankung als *Legionnaires' Disease* (Legionärskrankheit) bezeichnet (Fraser *et al.*, 1977). Diese Entdeckung legte den Grundstein für die Erforschung eines bis dato noch unbekannten Erregers der Legionärskrankheit. Mit Hilfe von retrospektiven Studien wurde der älteste beschriebene Fall einer Infektion durch Legionellen auf das Jahr 1943 und die Spezies *L. micdadei* zurückgeführt (Hébert *et al.*, 1980). Der erste *L. pneumophila* Stamm wurde bereits 1947 isoliert, konnte jedoch erst 1979 der Spezies zugeordnet werden (McDade *et al.*, 1979). Ein zweites durch Legionellen verursachtes, aber milder verlaufendes Krankheitsbild, das Pontiac-Fieber, wurde 1968 nach einem Ausbruch einer fieberhaften Erkrankung von 144 Personen in Pontiac (Michigan, USA) entdeckt (Glick *et al.*, 1978).

1.1 *Legionella pneumophila* – ein Krankheitserreger der Lunge

1.1.1 Mikrobiologie, Ökologie und Lebenszyklus des Lungenerregers

Legionellen sind Gram-negative, stäbchenförmige und obligat aerobe Bakterien mit polarer oder lateraler Begeißelung (Garrity *et al.*, 2004, Benson & Fields, 1998, McDade *et al.*, 1977). Die 2 bis 20 µm langen und im Durchmesser 0,3 bis 0,9 µm großen Umweltkeime sind ubiquitär in natürlichen aquatischen Habitaten, wie z.B. Seen, thermalen Quellen und Flüssen, aber auch im feuchten Boden und Schlamm verbreitet. Daneben kommen diese Keime ebenso in künstlichen feucht-wässrigen Umgebungen vor, wie z.B. Duschköpfen, Wasserleitungen, Klimaanlage und Kühltürmen. Ihre parasitische Lebensweise innerhalb ihrer natürlichen Wirte, den Protozoen, oder auch in Biofilmen, schützt sie vor ungünstigen Umwelteinflüssen. So kann der Organismus in einer feuchten Umgebung auch über einen langen Zeitraum bei Temperaturen von 0 bis 68 °C und einem pH von 5,0 bis 8,5 überleben sowie vor Antibiotika, Bioziden, osmotischem und thermalem Stress geschützt werden. Die Bakterien vermehren sich optimal zwischen 25 und 45 °C, wobei das Temperaturoptimum bei 37 °C liegt. Legionellen sind in der Regel keine freilebenden Bakterien, sondern replizieren sich intrazellulär in vielen verschiedenen Arten von Amöben, wie z. B. *Acanthamoeba castellanii* und *Hartmannella vermiformis*, sowie Ciliaten, können aber extrazellulär innerhalb von Biofilmen wachsen (Rowbotham, 1980, Diederer, 2008, Newton *et al.*, 2010, Brodhun & Buchholz, 2011, Taylor *et al.*, 2009). Die intrazelluläre Vermehrung ermöglicht den Bakterien den Zugang zu Nährstoffen, bietet Schutz vor äußeren Einflüssen und lässt sie den Wirt zu ihren Gunsten manipulieren (Rowbotham, 1980, Fields, 1996, Fields *et al.*, 2002). Das extrazelluläre Überleben der Bakterien wird während einer nährstoffarmen Zeit durch den Übergang in ein *viable but non cultureable* (VBNC)-Stadium erleichtert (Steinert *et al.*, 2007). Die Abhängigkeit von einer speziellen nährstoffreichen Umgebung erklären das spezifische Wachstumsmedium, welches *Legionella* unter Laborbedingungen benötigt. Die Zugabe wichtiger Aminosäuren, wie L-Cystein, Arginin, Isoleucin, Leucin, Valin, Threonin, Methionin, Phenylalanin, Serin und Tyrosin, die sie zum Teil nicht selbst synthetisieren können, sowie wichtiger Spurenelemente, wie Eisen, Mangan, Calcium, Zink, Kalium, Magnesium und Kupfer aber auch Phosphaten, stimuliert das Wachstum (George *et al.*, 1980, Fields *et al.*, 2002, Reeves *et al.*, 1981, Rowbotham, 1980). Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass nicht nur Aminosäuren als Energie- und Kohlenstoffquelle genutzt werden können, sondern auch Kohlenhydrate, wie Stärke und Glykogen (Eylert *et al.*, 2010, Herrmann *et al.*, 2011).

In den natürlichen Habitaten stellt das Bakterium normalerweise keine Gefahr für den Menschen dar. Erst das Vorkommen in künstlich angelegten Warmwasserleitungs- oder in stagnierenden Wasserzirkulationssystemen bietet optimale Bedingungen für eine Vermehrung der Legionellen, sodass die Anfälligkeit für Kontaminationen rapide ansteigt (Levin, 2009, Brodhun & Buchholz,

2011). Die Infektion mit Legionellen erfolgt in der Regel durch die Inhalation von kontaminierten Aerosolen (Stout & Yu, 1997, Levin, 2009). Somit stellen solche verunreinigten Wasservorkommen, die Aerosole erzeugen können, potentielle Ausbruchsquellen dar. Eine Übertragung von Mensch zu Mensch konnte bisher nicht beobachtet werden (Muder *et al.*, 1986, Fields *et al.*, 2002, Victor *et al.*, 1983).

L. pneumophila ist ein Erreger, der nicht nur seine natürlichen Wirte, die Amöben, sondern auch verschiedene Säugerzellen wie Makrophagen und Epithelzellen infizieren und zur Replikation nutzen kann. Über die Inhalation kontaminierter Aerosole bekommt das Bakterium Zugang zur humanen Lunge. Dies ermöglicht dem Erreger alveolare Makrophagen und Epithelzellen in einer ähnlichen Weise zu besiedeln wie es bei den in der Natur vorkommenden Protozoen geschieht (Albert-Weissenberger *et al.*, 2007, Lau & Ashbolt, 2009, Fields, 1996, Gao *et al.*, 1997, Segal & Shuman, 1999*, Fields *et al.*, 2002).

Innerhalb der Wirtszelle weist *L. pneumophila* einen biphasischen Lebenszyklus auf, bestehend aus einer replikativen (nicht virulenten) und einer transmissiven (virulenten) Phase (Abb. 1.1). Beide Phasen sind gekennzeichnet durch unterschiedliche Physiologien und Morphologien. Der Lebenszyklus mit seinen spezifischen Phasen kann unter Laborbedingungen und in Flüssigmedium nachgeahmt werden, wobei die exponentiell gewachsene *Legionella*-Kultur die replikativen Merkmale und die spät-exponentiell/stationär gewachsene Kultur die transmissiven Merkmale widerspiegelt (Byrne & Swanson, 1998, Molofsky & Swanson, 2004, Brüggemann *et al.*, 2006, Weissenmayer *et al.*, 2011).

Legionellen der replikativen Phase sind nicht zytotoxisch. Ihr Genexpressionsmuster wird durch das Nahrungsangebot bestimmt, welches essentiell für die effiziente Vermehrung ist. Die replikative Phase ist demnach durch hohe metabolische Aktivität und Proteinbiosynthese mit einhergehender Replikation des Bakteriums gekennzeichnet. In dieser Phase sind die stäbchenförmigen Legionellen durch eine lange, teils filamentöse Gestalt und Unbeweglichkeit (fehlendes Flagellum) charakterisiert (Steinert *et al.*, 2002, Molofsky & Swanson, 2004). Mit abnehmenden Nährstoffressourcen, z.B. den Aminosäuren im Kulturmedium, wechseln die Bakterien in ein zytotoxisches Stadium, in dem die Genexpression auf die Bereitstellung neuer Nährstoffquellen und somit auch auf das Verlassen des Wirtes abzielt. Im Kulturmedium induziert *Legionella* hierbei die Akkumulation des Stressmoleküls Guanosin-3',5'-bispyrophosphat (ppGpp), was den Übergang in die transmissive und somit auch infektiöse Phase vermittelt (Hammer & Swanson, 1999, Molofsky & Swanson, 2004). Die σ -Faktoren RpoS und FliA, das Zwei-Komponenten-Regulationssystem LetA/LetS sowie das Regulatorprotein LetE vermitteln diesen Prozess (Bachman & Swanson, 2004, Hammer *et al.*, 2002, Zusman *et al.*, 2002). Die

Verlangsamung des Metabolismus und die Aktivierung von Genen zur Ausprägung der transmissiven Eigenschaften sowie zur Manipulation des Wirts sind charakteristisch für dieses Stadium. Hierzu zählen Gene, die für den Bewegungsapparat, für Typ IVB (Dot/Icm)-Effektoren, sowie für andere Faktoren, die mit Invasion und Virulenz assoziiert werden, kodieren (Weissenmayer *et al.*, 2011, Brüggemann *et al.*, 2006). Die transmissiven stäbchenförmigen Bakterien sind demzufolge durch ihre hohe Beweglichkeit, Zytotoxizität und Invasivität charakterisiert. Weiterhin zeigen sie ein resistentes Verhalten gegenüber Stressfaktoren, wie z.B. ein saurer pH-Wert und osmotischer Stress (Byrne & Swanson, 1998, Steinert *et al.*, 2002).

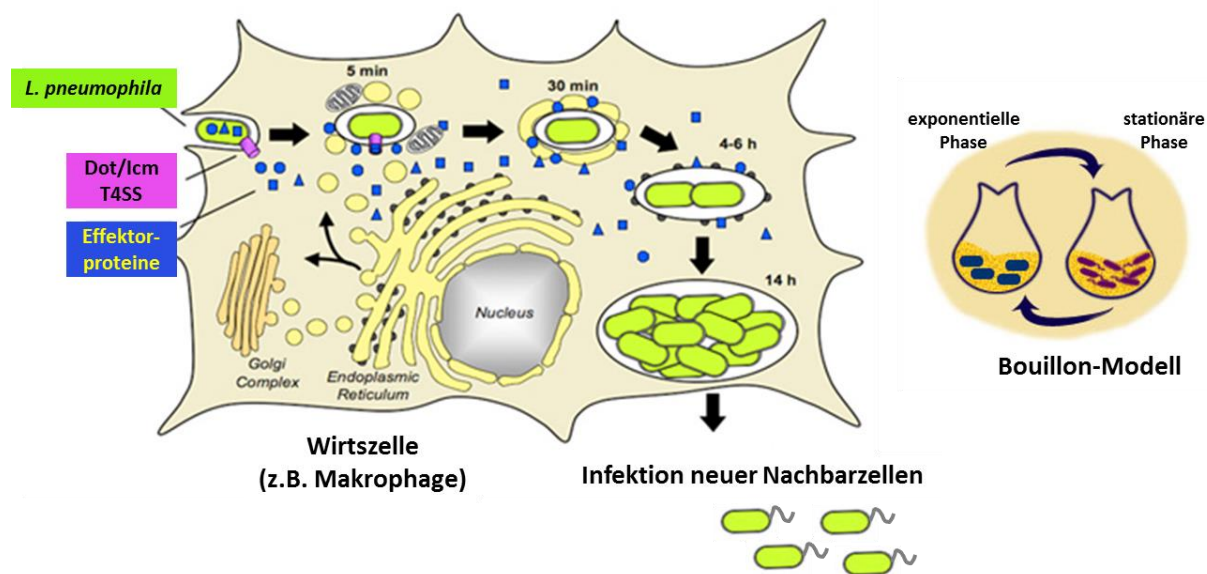


Abb. 1.1: Der Lebenszyklus von *L. pneumophila*. *L. pneumophila* repliziert sich intrazellulär in Protozoen. Das Einatmen kontaminierter Aerosole ermöglicht dem Bakterium den Zugang zur humanen Lunge und dort die Besiedlung alveolarer Makrophagen und Epithelzellen (links). Bei der Phagozytose infektiöser Legionellen werden Effektoren sekretiert, die die Besiedlung des Wirts erleichtern. Dies sind Faktoren zur Verhinderung der Ansäuerung der Vakuole und der Apoptose des Wirtsorganismus, Effektoren zur Rekrutierung von Vesikeln des endoplasmatischen Retikulums (ER) und Mitochondrien. Es erfolgt die Verschmelzung der Vakuole (auch LCV genannt) mit dem ER. Innerhalb der LCV replizieren sich die Bakterien bis ein Nährstoffmangel eintritt. Ab diesem Zeitpunkt gehen die Legionellen in die transmissive Phase über, was zur Lyse der Wirtszelle führt. Infektiöse Legionellen können nun eine neue Wirtszelle besiedeln. Der biphasische Lebenszyklus von *Legionella*, mit der replikativen (exponentiellen) und der transmissiven (stationären) Phase, kann unter Laborbedingungen in Bouillon nachgestellt werden (rechts) (modifiziert nach 2009annualreport.nichd.nih.gov; metapathogen.com).

Im Gegensatz zum Kulturmedium beginnt der intrazelluläre Generationszyklus mit der Aufnahme des Bakteriums in die Wirtszelle. Dabei werden verschiedene Mechanismen für den Eintritt aber auch für den Austritt aus den Wirt genutzt, wie z.B. die Aufnahme durch konventionelle Phagozytose bzw. die *coiling*-Phagozytose (Lau & Ashbolt, 2009, Newton *et al.*, 2010). In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass der erste Kontakt zwischen *Legionella* und den Makrophagen über ein Protein der äußeren Membran, dem sogenannten MOMP-Protein (*major outer membrane protein*), erfolgt. MOMP bindet dabei über die Komplementbestandteile C3b und

C3bi an die Komplementrezeptoren CR1 und CR3 der Wirtszelle (Payne & Horwitz, 1987, Bellinger-Kawahara & Horwitz, 1990, Wiater *et al.*, 1998). Die Adhäsion an Protozoen, z.B. über Typ IV-Pili oder die Lektinbindung, wird dagegen als komplementunabhängiger Mechanismus zur Förderung der Phagozytose diskutiert (Cirillo *et al.*, 1999, Swanson & Hammer, 2000, Stone & Kwaik, 1998, Venkataraman *et al.*, 1997, Harb *et al.*, 1998). Nach der phagozytären Aufnahme verbleiben die Legionellen in einem Phagosom, welches nicht den phagolysosomalen Pfad einschlägt. Das Bakterium verhindert hierbei aktiv und mit Hilfe des Dot/Icm-Sekretionssystems die Fusion mit Lysosomen und somit eine Absenkung des pH-Wertes in diesem Kompartiment (Horwitz, 1983, Horwitz & Maxfield, 1984, Roy *et al.*, 1998, Molofsky & Swanson, 2004). Die dabei entstehende Vakuole (*Legionella containing vacuole*, LCV) ist vollständig vom endosomalen Pfad isoliert. Bereits nach kürzester Zeit erfolgt die Rekrutierung sekretorischer Vesikel des endoplasmatischen Retikulums (ER) sowie von Mitochondrien an die LCV (Tilney *et al.*, 2001). Innerhalb dieser Vakuole repliziert sich *Legionella*, wobei der pH-Wert im neutralen Bereich aufrechterhalten wird (Wieland *et al.*, 2004). Erst in der späten replikativen Phase, wenn die Bakterien eine Säureresistenz entwickelt haben, fusioniert die LCV mit dem Lysosom, um die Nährstoffversorgung aufrechtzuerhalten (Sturgill-Koszycki & Swanson, 2000). Sobald Nährstoffmangel auftritt, gehen die Erreger auch intrazellulär in die transmissive Phase über, wobei bakterielle transmissive Faktoren, wie z.B. Toxine, Adhäsine und Flagellen, exprimiert werden (Byrne & Swanson, 1998, Molofsky & Swanson, 2004, Brüggemann *et al.*, 2006). Das Differenzieren der Bakterien zurück in ihre transmissive Form ermöglicht ihnen den Übergang in das sogenannte MIF-Stadium (*mature intracellular form*), das durch Polyhydroxybutyrateinschlüsse sowie Antibiotika- und pH-Resistenz ein längeres Überleben in der Umwelt ermöglicht. Die starke Vermehrung führt zur Schädigung der Wirtszellmembran und somit zur Zelllyse bzw. zum Zelltod des Wirts (Molofsky & Swanson, 2004, Molofsky *et al.*, 2005, Swanson & Hammer, 2000, Isberg *et al.*, 2009, Newton *et al.*, 2010). Diese induzierte kontaktabhängige Zellzytotoxizität wird durch Porenbildung in der Wirtszellmembran verursacht (Husmann & Johnson, 1994, Kirby *et al.*, 1998). Die Gruppe um Silveira und Zamboni entdeckte, dass die Poren bei Säugerzellen aus der Aktivierung des Inflammasoms des Wirtes durch bakterielles Flagellin verursacht werden (Silveira & Zamboni, 2010). Die freigesetzten hochvirulenten Erreger sind nun in der Lage, neue Zellen zu infizieren.

1.1.2 Legionellose – Krankheitsbild und Therapie

Nach einer Übertragung von *Legionella*-haltigen Aerosolen auf den Menschen kann sich das Krankheitsbild einer Legionellose manifestieren. Zum einen können die Erreger nach einer Infektion der alveolaren Makrophagen eine atypische, oft tödliche Pneumonie, die sogenannte

Legionärskrankheit, verursachen (McDade *et al.*, 1977, Horwitz & Silverstein, 1980). Nach einer relativ kurzen Inkubationszeit treten hohes Fieber ($>40^{\circ}\text{C}$), Kopf- und Muskelschmerzen sowie eine schwere Lungenentzündung auf. In schweren Fällen kommt es zu Schädigungen der Nieren und des zentralen Nervensystems mit geistiger Verwirrtheit und Delirium (Fields *et al.*, 2002). Diese Erkrankung kann dabei durch respiratorische Insuffizienz und Sepsis tödlich verlaufen (Edelstein, 2008). Histopathologische Untersuchungen einer infizierten Lunge zeigen eine durch proteinöse Exsudate sowie durch Exsudate der Makrophagen und Neutrophilen verursachte Ausdehnung des alveolaren Raumes und eine diffuse Zerstörung des alveolaren Gewebes. Des Weiteren zählen septische Vaskulitis kleiner Blutgefäße und Koagulationsnekrosen zu den charakteristischen Merkmalen. Es konnte zudem eine lymphatische und hämatogene Ausbreitung des Erregers beschrieben werden, wobei hauptsächlich die Leber und die Nieren betroffen sind (Hernandez *et al.*, 1980, Hicklin *et al.*, 1980, Winn Jr & Myerowitz, 1981). Zum anderen kann sich ein weniger schwerwiegender und selbstlimitierender respiratorischer Infekt ohne Pneumonie, das sogenannte Pontiac-Fieber, entwickeln (Glick *et al.*, 1978, Kaufmann *et al.*, 1981). Diese Verlaufsform äußert sich in grippeähnlichen Symptomen, die auch ohne Behandlung wieder abklingen (Fields *et al.*, 2002). Die Charakteristika dieser beiden Formen der Legionellen-Infektion sind in der nachfolgenden Tabelle 1.1 zusammengefasst.

Tab. 1.1: Übersicht über die zwei verschiedenen Formen einer Legionellen-Infektion.
(<http://wwwnc.cdc.gov>; Lück & Steinert, 2006)

Charakteristika	Pontiac-Fieber	Legionärskrankheit
Häufigkeit	~10x häufiger als Pneumonie	1-5% (bis 30%) aller Pneumonien
Klinisches Bild	Leichte grippale Symptome ohne Pneumonie (Schüttelfrost, Fieber, Kopfschmerzen, Abgeschlagenheit)	Lungenentzündung, hohes Fieber, Muskelschmerzen im Brustkorb, Reizhusten, neurologische Ausfallerscheinungen, Atemnot, Übelkeit
Manifestationsrate	90-98%	1-5%
Inkubationszeit	1-2 Tage	2-14 (-20) Tage
Krankheitsdauer	2-5 Tage	2-3 Wochen
Letalität	0	2-10% (bis 80%)
Isolation der Bakterien	nahezu nie	möglich
Therapie	nicht erforderlich, da selbstlimitierend	Gabe spezifischer Antibiotika nötig (Fluorchinolone und Makrolide)

Daneben gibt es zwei weitere Verlaufsformen. Die extrarrespiratorische Manifestation äußert sich durch Wundinfektionen nach dem Baden in *Legionella*-haltigem Wasser und kann ebenso als Begleiterscheinung bei schweren Pneumonien mit septischer Streuung erfolgen. Dies kann zur Proktitis und Herzklappenendokarditis führen. Die subklinischen Infektionen werden nur durch

die Bildung von Antikörpern in Seren exponierter Personen nachgewiesen und treten vermutlich häufiger auf als klinische Erkrankungen (Lück, 2011, Lück & Steinert, 2006).

1.2 Virulenzfaktoren von *L. pneumophila*

Virulenzfaktoren sind Determinanten eines Mikroorganismus, die seine pathogene Wirkung bestimmen. Diese können sowohl Strukturelemente als auch Stoffwechselprodukte sein. *L. pneumophila* weist zahlreiche bakterielle Virulenzdeterminanten auf, die in anderen Bakterien eine wichtige Rolle für die Pathogenität spielen. Hierzu zählen unter anderem die Lipopolysaccharide (LPS), Pili, Flagellen, Toxine, Sekretionssysteme, Enzyme wie z.B. Proteasen, Phosphatasen und Phospholipasen sowie Zelloberflächenproteine (Newton *et al.*, 2010, Dowling *et al.*, 1992). In der Umwelt repliziert sich *Legionella* innerhalb eines breiten Wirtsspektrums. Für die Wirtsadaptation haben die Bakterien vielfältige Virulenzmechanismen entwickelt, die es ihnen ebenso ermöglichen, humane Zellen zu besiedeln. Die Fähigkeit zur intrazellulären Replikation in Makrophagen wird als ein bedeutendes Virulenzmerkmal angesehen (Cianciotto, 2001). Das *macrophage infectivity potentiator (mip)*-Gen ist für die intrazelluläre Infektion in der frühen Phase von Makrophagen, Protozoen, Lungenepithelzellen sowie für die Virulenz in Tiermodellen erforderlich und war eines der ersten Gene, das mit der Fähigkeit zur Replikation von *Legionella* innerhalb der Wirtszelle assoziiert wurde (Cianciotto *et al.*, 1989, Cianciotto *et al.*, 1990, Cianciotto *et al.*, 1995, Cianciotto & Fields, 1992, Susa *et al.*, 1996, Wintermeyer *et al.*, 1995). Das 24 kDa große *mip*-Genprodukt ist ein Zelloberflächenprotein und besitzt Peptidylprolyl-cis/trans-Isomerase Aktivität (Cianciotto *et al.*, 1990*, Fischer *et al.*, 1992, Helbig *et al.*, 2001). Die Bindung des Mip-Proteins an Kollagene der extrazellulären Matrix ermöglicht *Legionella* die Überwindung der Lungenepithelzellbarriere (Wintermeyer *et al.*, 1995, Helbig *et al.*, 2001, Helbig *et al.*, 2003, DebRoy *et al.*, 2006*, Wagner *et al.*, 2007). Es ermöglicht dem Bakterium, die Lunge zu kolonisieren und sich in Organe der Peripherie, wie z.B. der Milz, weiter auszubreiten. Das schon erwähnte, mit den Peptidoglycanen assoziierte Porin der äußeren Membran MOMP wird als ein wichtiger Faktor für die Infektion angesehen, da es an der Aufnahme des Bakteriums in die Wirtszelle beteiligt ist (Sadosky *et al.*, 1993, Gabay *et al.*, 1985, Hoffman *et al.*, 1992). Abgesehen von den eben genannten Virulenzfaktoren spielen die Protein-Sekretionssysteme, besonders vom Typ II und Typ IVB, eine wesentliche Rolle in der Pathogenese von *L. pneumophila*, weshalb auf diese im nächsten Abschnitt (1.3) näher eingegangen wird. Zudem tragen bakterielle Phospholipasen wesentlich zur Virulenz bei, weswegen diese Enzymklasse in Abschnitt 1.4 detaillierter beschrieben und ihre Rolle als Virulenzfaktor erörtert wird. *L. pneumophila* besitzt eine Vielfalt von Phospholipasen, die potentiell in krankheitsfördernde Prozesse involviert sind, was in Abschnitt 1.5 thematisiert wird.

1.3 Sekretionssysteme von *L. pneumophila*

Um eine erfolgreiche Pathogen-Wirts-Interaktion zu ermöglichen, benötigt *L. pneumophila* Sekretionssysteme, welche ein vielfältiges Arsenal an Effektorproteinen zur bakteriellen Oberfläche, direkt in die Wirtszelle oder in die extrazelluläre Umgebung translozieren. Für *Legionella* wurde bisher das putative Sekretionssystem vom Typ I (Lss), verschiedene Typ IVA-Sekretionssysteme (LvH, Trb-1, Trb-2), ein putativer Typ V-Autotransporter sowie die zwei Sekretionsmaschinerien vom Typ II (Lsp) und Typ IVB (Dot/Icm) beschrieben, wobei die beiden letztgenannten mit der Virulenz des Erregers in Verbindung gebracht werden konnten (Cianciotto, 2014, Qiu & Luo, 2014, Albert-Weissenberger *et al.*, 2007, De Buck *et al.*, 2007, Brassinga *et al.*, 2003, Cazalet *et al.*, 2004, Glöckner *et al.*, 2008, Jacobi & Heuner, 2003, Schroeder *et al.*, 2010, Segal *et al.*, 1999). Daneben besitzt *L. pneumophila* einen Flagellenapparat, welcher als potentiell Typ III-ähnliches Sekretionssystem angesehen wird (Cornelis, 2006, Heuner & Steinert, 2003, Molofsky *et al.*, 2005). Die Translokation der Substrate kann entweder in zwei Stufen über die Membranen oder ohne periplasmatischen Zwischenschritt erfolgen, wie es bei Typ I und Typ IV der Fall ist. Bezüglich der Sekretion über den Typ II- und Typ V-Sekretionsweg gelangen die Proteine zunächst über den Sec- oder Tat-abhängigen Transport aus dem Zytosol über die innere Membran ins Periplasma. Sowohl der allgemeine Proteinsekretionsweg Sec als auch ein Twin-Arginin-Translokationssystem (Tat) wurden für *Legionella* beschrieben (De Buck *et al.*, 2004, De Buck *et al.*, 2005, Rossier & Cianciotto, 2005, Cazalet *et al.*, 2004, Chien *et al.*, 2004). Proteine, die über diesen Transportweg transloziert werden, verfügen im Allgemeinen über ein N-terminales Signalpeptid, das durch eine membrangebundene Signalpeptidase abgespalten wird (De Buck *et al.*, 2007). In *L. pneumophila* wurden zwei verschiedene Signalpeptidasen identifiziert. Die Typ I Signalpeptidase LepB ist verantwortlich für das Abspalten von Sec- und Tat-abhängigen Signalpeptiden, wohingegen die Typ II Signalpeptidase LspA Lipoproteine prozessiert (Lammertyn *et al.*, 2004, Geukens *et al.*, 2006).

Das Lsp Typ II-Sekretionssystem exportiert viele degradierende Enzyme, welche die Infektion sowohl von Protozoen als auch von Makrophagen fördern und zum Wachstum innerhalb der humanen Lunge beitragen (Rossier & Cianciotto, 2001, Rossier *et al.*, 2004, Cianciotto, 2009, DebRoy *et al.*, 2006). Erst kürzlich zeigte die Gruppe um N. P. Cianciotto, dass das Lsp-System ebenso die Infektion von Lungenepithelzellen fördert sowie die Zytokin- bzw. Chemokinfreisetzung aus Makrophagen und Epithelzellen z.B. durch das Eingreifen in das Transkriptlevel der Zytokine verringert (McCoy-Simandle *et al.*, 2011). Bisher konnten insgesamt mehr als 25 Typ II-abhängig sekretierte Proteine identifiziert werden (Cianciotto, 2014, Cianciotto, 2009, McCoy-Simandle *et al.*, 2011). Hier sind vor allem die ProA (Msp)-Protease

(Hales & Shuman, 1999), die Chitinase (DebRoy *et al.*, 2006), die saure Phosphatase (Aragon *et al.*, 2001), die RNase (Rossier *et al.*, 2009), die Lipasen A und B (LipA und LipB) (Aragon *et al.*, 2002), die Phospholipasen C (PlcA und PlcB) (Aragon *et al.*, 2002, McCoy-Simandle *et al.*, 2011, Aurass *et al.*, 2013) und Phospholipase A/Lysophospholipase (PlaA und PlaC) zu nennen (Banerji *et al.*, 2005, Flieger *et al.*, 2002, DebRoy *et al.*, 2006). Die sekretierten Proteine werden bei dem schon erwähnten mehrstufigen Prozess der Typ II-Sekretion zunächst über den Sec- oder Tat-Weg durch die innere Membran transloziert und ins Periplasma entlassen, wo ungefaltete Proteine ihre Tertiärstruktur annehmen (Cianciotto, 2005, Cianciotto, 2014). Anschließend erfolgt die Translokation der Proteine durch die äußere Membran über den Multiprotein-Komplex der Typ II-Sekretionsmaschinerie (Cianciotto, 2014, Cianciotto, 2009). Der evolutionär mit dem Typ IV-Pili verwandte Sekretionsapparat besteht aus einer zytoplasmatischen ATPase (LspE), drei Proteinen der inneren Membran (LspF, L und M), welche eine Plattform und Bindungsstelle für die ATPase darstellen, Pseudopilinen (LspG, H, I, J und K), die eine den periplasmatischen Raum umspannende pilusartige Struktur bilden, einer Peptidase der inneren Membran (LspO), welche Pseudopiline vor ihrer Integration in den Sekretionsapparat prozessiert, einem Sekretin der äußeren Membran (LspD), das zur Sekretionspore oligomerisiert und einem Protein (LspC), welches innere und äußere Membrankomponenten zu vernetzen scheint (Cianciotto, 2005, Cianciotto, 2014, Johnson *et al.*, 2006, Filloux, 2004, Peabody *et al.*, 2003).

Das Dot/Icm Typ IVB-Sekretionssystem ist an vielen verschiedenen Stufen des intrazellulären Lebenszyklus beteiligt und spielt somit eine Schlüsselrolle in der Virulenz von *L. pneumophila*. Es ist unter anderem essentiell für die Replikation in Protozoen, humanen Makrophagen sowie im Meerschweinchen-Modell (Segal & Shuman, 1999*, Edelstein *et al.*, 1999) und spielt eine kritische Rolle in der Förderung der Phagozytose, bei der Gestaltung der nährstoffreichen LCV, bei der Unterstützung der Integrität des Phagosoms und bei der Induktion von Apoptose und Zelllyse (Molmeret *et al.*, 2007). Das von etwa 27 Genen kodierte Sekretionssystem, welches einer klassischen Konjugationsmaschinerie ähnelt, kann in drei Subkomplexe unterteilt werden. Diese setzen sich zusammen aus einem Rezeptor der inneren Membran zum Erfassen der Substrate, dem transmembranen Kern, welcher die innere mit der äußeren Membran verbindet, und einem Proteinteil außerhalb der Membran, der sich von der bakteriellen Oberfläche erstreckt und vermutlich in die Membran der Wirtszelle penetriert (Qiu & Luo, 2014). Luo und Isberg konnten anhand der zwei Substrate RalF und LidA zeigen, dass keine N-terminale, sondern eine C-terminale Peptidsequenz die Translokation über die zwei Membranen vermittelt (Luo & Isberg, 2004). Die Gruppe um C. R. Roy deckte weiterhin auf, dass drei hydrophobe Reste oder ein Prolinrest nahe des C-terminalen Endes für die Translokation entscheidend sind (Nagai *et al.*,

2005). Weitere Studien identifizierten neben den hydrophoben Resten auch einige kleine, polare und geladene Reste innerhalb einiger Substrate (Kubori *et al.*, 2008). Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass nicht nur eine spezifische Aminosäure an einer bestimmten Position, sondern Aminosäuren mit ähnlichen physikalisch-chemischen Eigenschaften innerhalb der letzten 35 Positionen des C-Terminus die Dot/Icm-Translokation bestimmen (Lifshitz *et al.*, 2013). Zudem entdeckten Huang *et al.* ein weiteres Motiv, den sogenannten E-Block, als wichtige Sequenz zur Translokation (Huang *et al.*, 2011). Für die Manipulation von Wirtszellprozessen, injiziert *L. pneumophila* eine Fülle von etwa 300 bekannten Effektorproteinen in das Wirtszytosol oder zur phagosomalen Membran (Ensminger & Isberg, 2009, Hubber & Roy, 2010, Heidtman *et al.*, 2009, Zhu *et al.*, 2011, Gomez-Valero *et al.*, 2011), von denen viele Ähnlichkeiten zu eukaryotischen Proteinen aufweisen (Nora *et al.*, 2009). Experimentell wurden bereits 290 Substrate bestätigt. Zu diesen zählen unter anderem die schon genannte Signalpeptidase LepB, Phospholipasen A (VipD/PatA; VpdA/PatC; VpdB/PatG; VpdC/PatF), Phospholipase C (PlcC/CegC1) und Phospholipase D (LpdA) (Gomez-Valero *et al.*, 2011, Lifshitz *et al.*, 2013, Zhu *et al.*, 2011). Die Dot/Icm-Substrate beeinflussen verschiedene zelluläre Prozesse innerhalb des Wirtes, wie z.B. den Vesikelverkehr, Abläufe im Rahmen des Zelltodes, Ubiquitinierung, Lipidmetabolismus und die angeborene Immunabwehr, um den Aufbau einer intrazellulären Nische für die bakterielle Replikation zu ermöglichen (Hubber & Roy, 2010, Isberg *et al.*, 2009). Zudem ist ein weiteres Typ IV-Sekretionssystem (Typ IVA), das Lvh-System, bekannt, dem eine Rolle in einigen Aspekten der intrazellulären Replikation von *L. pneumophila* zugeschrieben wird, z.B. dass es die Dot/Icm-Funktionen komplementieren kann (Bandyopadhyay *et al.*, 2007, Segal *et al.*, 1999).

Für das Lss Typ I-Sekretionssystem konnten bisher noch keine Sekretionssubstrate identifiziert werden. Zudem scheint es für die Pathogen-Wirts-Interaktion entbehrlich zu sein (Jacobi & Heuner, 2003). Für das putative Typ V-Sekretionssystem wurden die Funktionalität oder mögliche Substrate noch nicht charakterisiert (De Buck *et al.*, 2007). Es wurde jedoch ein Gen (*lpp0779*) aus dem *L. pneumophila* Paris Stamm identifiziert, welches für einen möglichen Autotransporter kodiert (Albert-Weissenberger *et al.*, 2007).

1.4 Bakterielle Phospholipasen als Virulenzfaktoren

Die mannigfaltige Unterklasse der Lipasen/Esterasen, die Phospholipasen, sind ubiquitär verbreitete Enzyme, die sowohl in eukaryotischen als auch in prokaryotischen Organismen vorkommen und in eine Vielzahl zellulärer Funktionen, wie z. B. der Generierung sekundärer Botenstoffe, Entzündungsreaktionen, Membransynthese und –zusammensetzung, involviert sind (Dennis *et al.*, 1991, Ibarguren *et al.*, 2010, Linkous & Yazlovitskaya, 2010, Sreenivas *et al.*,

1998). Als Virulenzfaktoren pathogener Bakterien unterstützen sie eine Reihe von Prozessen, die unter anderem die Invasion und Besiedlung eines Wirts begünstigen. Die katalytisch aktiven Zentren, einschließlich der typischen Sequenzmotive, sind innerhalb der Phospholipasen/Lipasen auch evolutionär unterschiedlicher Spezies stark konserviert (Akoh *et al.*, 2004, Arpigny & Jaeger, 1999, Banerji & Flieger, 2004, Messaoudi *et al.*, 2010, Upton & Buckley, 1995). Diese Ähnlichkeiten verschaffen den bakteriellen Erregern während eines Wirtskontaktes den Vorteil, dass die eigenen Phospholipasen die Phospholipasen des Wirts ersetzen können, um zelluläre Prozesse zu ihren Gunsten einzusetzen. Als Substrate nutzen Phospholipasen Phospholipide, welche sich üblicherweise zu subzellulären Strukturen in Form von Einzel- oder Doppelschichten zusammenlagern. Üblicherweise bestehen Phospholipide aus einem Glycerol-Rückgrat mit zwei veresterten Fettsäureketten und einer Phosphatgruppe. In Säugerzellen kommen vor allem Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylinositol (PI), Phosphatidylserin (PS) und Sphingomyelin (SM) vor (Schmiel & Miller, 1999, Virtanen *et al.*, 1998, Mason & Williams, 1980). Für die Membranstrukturen von *Legionella* wurden hauptsächlich PC, PE, Phosphatidylglycerol (PG) und Cardiolipin (CL) identifiziert (Finnerty *et al.*, 1979, Hindahl & Iglewski, 1984).

1.4.1 Die Klassifizierung und Eigenschaften von Phospholipasen

Phospholipasen werden entsprechend ihrer enzymatischen Spaltstellen am Phospholipid in Acylhydrolasen (Phospholipase A₁/A₂ = PLA, Phospholipase B = PLB) und Phosphodiesterasen (Phospholipase C = PLC, Phospholipase D = PLD) unterteilt. Die Großbuchstaben A, B, C und D werden dabei mit der spezifisch angegriffenen Esterbindung im Phospholipid assoziiert (Abb. 1.2) (Aloulou *et al.*, 2012, Ramrakhiani & Chand, 2011). Demnach spalten die Acylhydrolasen die Acyl-Esterbindung an der sn-1-Position (PLA₁) bzw. an der sn-2-Position (PLA₂) des Glycerols. Als Reaktionsprodukte entstehen eine freie Fettsäure (FFA) und im Falle einer PC-Hydrolyse das toxische Lysophosphatidylcholin (LPC) (Huang *et al.*, 2005, Masamune *et al.*, 2001). Enzyme mit entsprechender Lysophospholipase A-Aktivität (LPLA-Aktivität) hydrolysieren den verbleibenden Fettsäurerest am Glycerol-Rückgrat und eliminieren so das toxische LPC, wobei Glycerophosphorylcholin entsteht. PLBs können die Fettsäureketten sowohl an der sn-1- als auch an der sn-2-Position abspalten. Die Phosphodiesterasen hydrolysieren hingegen entweder die Glycerol-orientierte (PLC) oder die Alkohol-orientierte (PLD) Phosphoesterbindung im Substrat, wobei 1,2-Diacylglycerol (1,2-DG) und ein Phosphorylalkohol bzw. Phosphatidsäure (PA) und ein Alkohol entstehen (s. Abb. 1.2). Generell besitzen Phospholipasen verschiedene Substratspezifitäten, die sich vor allem nach den Eigenschaften der gebundenen Fettsäuren (Kettenlänge, Sättigung) und der polaren Kopfgruppe (gebundener Alkohol) richten (Schmiel &

Miller, 1999). Der folgende Absatz beschäftigt sich mit der Klassifizierung und den generellen Eigenschaften der PLAs, da im Rahmen dieser Arbeit ein Enzym dieser Gruppe charakterisiert wurde.

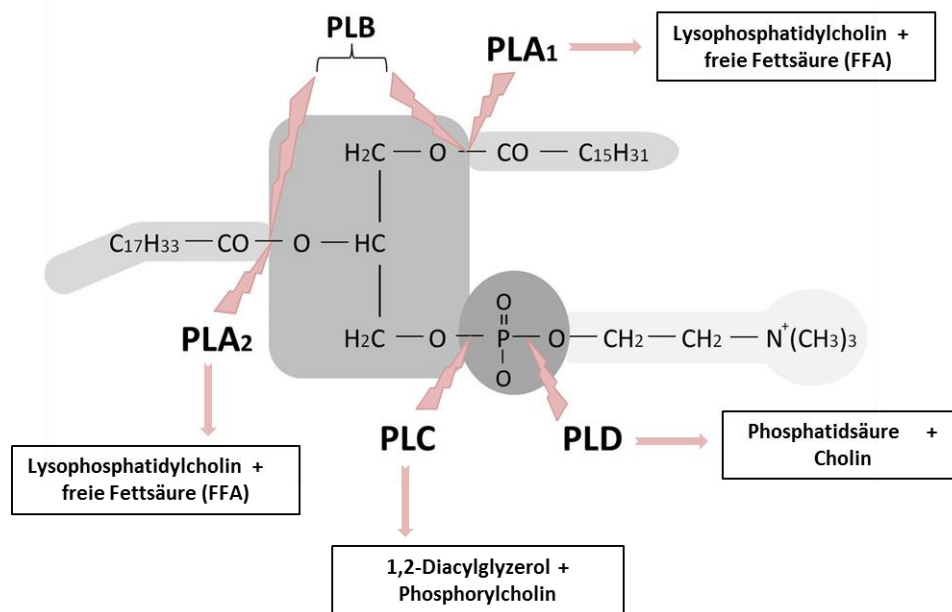


Abb. 1.2: Die Darstellung der enzymatischen Spaltung von Phospholipiden am Bsp. von Phosphatidylcholin mittels verschiedener Phospholipasen und der entstehenden Reaktionsprodukte. Phospholipide bestehen aus einem Glycerol-Rückgrat (grau), welches mit zwei Fettsäuren an Position sn-1 und sn-2 (mittelgrau) und einer Phosphatgruppe an Position sn-3 (dunkelgrau) verestert ist. Am Phosphatrest sind zudem polare Kopfgruppen, wie z.B. Cholin (hellgrau) verestert. (in Anlehnung an (Kuhle & Flieger, 2014).

Arpigny und Jäger identifizierten acht verschiedene Familien innerhalb der bakteriellen Acylhydrolasen/Lipasen. Ihre Einteilung basiert auf dem Vergleich der Aminosäuresequenz und den grundlegenden biologischen Eigenschaften dieser Gruppe (Arpigny & Jaeger, 1999). Diese Familien nutzen eine katalytische Triade bestehend aus Ser-Asp-His für ihre enzymatischen Aktivitäten und weisen eine typische Faltung der α/β -Hydrolasen auf. Innerhalb der ersten zwei Familien konnten Enzyme mit PLA-Aktivität identifiziert werden.

Die Enzyme der Familie I, auch bekannt als echte Lipasen, hydrolysieren neutrale Lipide und werden nochmals in elf Subfamilien unterteilt. Diese Familie ist die am weitesten verbreitete innerhalb der Gram-positiven und -negativen Bakterien (Arpigny & Jaeger, 1999, Messaoudi *et al.*, 2010). Mitglieder dieser Familie besitzen das konservierte Gly-X-Ser-X-Gly Motiv mit seinem nukleophilen Serin (Ser) sowie die zwei katalytisch aktiven Aminosäuren Aspartat (Asp) und Histidin (His). Die Substratpräferenz beschränkt sich jedoch bei einigen Enzymen dieser Gruppe nicht nur auf neutrale Lipide (Arpigny & Jaeger, 1999). In seltenen Fällen gibt es Vertreter, welche ebenfalls amphiphile Phospholipide hydrolysieren können, wie z.B. eine Lipase

aus *Staphylococcus hyicus* oder aus *S. warneri* (Van Kampen *et al.*, 1998, van Kampen *et al.*, 2001, Van Oort *et al.*, 1989).

Enzyme der Familie II sind als GDSL-Esterasen bekannt, da das katalytisch aktive Ser von einem Gly-Asp-Ser-(Leu/Ile) Motiv umgeben ist. Dieses ist im Homologie-Block I von insgesamt fünf konservierten Blöcken lokalisiert. Die putativen katalytischen Aminosäurereste His und Asp dagegen befinden sich im Block V innerhalb eines Asp-X-X-His Sequenzmotivs (Akoh *et al.*, 2004, Arpigny & Jaeger, 1999, Upton & Buckley, 1995). Mitglieder dieser Familie sind sowohl innerhalb vieler Bakterien aber auch in höheren Pflanzen vertreten (Upton & Buckley, 1995, Akoh *et al.*, 2004, Brick *et al.*, 1995). Die Lipasen dieser Familie weisen eine α/β -Faltung auf, die sich von der typischen Faltung der α/β -Hydrolasen unterscheidet. Des Weiteren variieren sie in anderen Charakteristika im Vergleich zu den gut bekannten α/β -Hydrolasen, wie z.B. dem Abstand des nukleophilen Ser-Restes zum N-Terminus sowie der nahen Lage der zwei anderen katalytischen Aminosäurereste zueinander (Akoh *et al.*, 2004, Upton & Buckley, 1995, Mølgaard *et al.*, 2000). Zudem sind diese hydrolytischen Enzyme mit multifunktionellen Eigenschaften in Hinblick auf ihre Substrat- und Regiospezifität ausgestattet. Neben der Lipase/Acylhydrolase-Aktivität weisen sie ebenso PLA-, LPLA-, hämolysische und Acyltransferase-Aktivitäten auf (Arpigny & Jaeger, 1999, Banerji *et al.*, 2008, Lang *et al.*, 2012, Shinoda *et al.*, 1991, Upton & Buckley, 1995). Das Paradebeispiel der bakteriellen GDSL-Esterasen stellt SatA aus *Aeromonas salmonicida* dar, eine Glycerophospholipid:Cholesterol-Acyltransferase (GCAT) (Buckley *et al.*, 1982), die unter anderem Fettsäureketten auf Cholesterol überträgt, ein eher untypisches Sterol in Bakterien (van der Meer-Janssen *et al.*, 2010). Vertreter dieser GDSL-Hydrolase-Gruppe gibt es auch in *L. pneumophila*, die in Abschnitt 1.5.1 beschrieben werden.

Eine neue Lipasefamilie in Bakterien stellen die Patatin-ähnlichen Proteine (PLP) dar, welche nach ihrer Sequenz-Homologie zum Patatin, einem verbreiteten Protein in der Kartoffelknolle mit Lipidacylhydrolase-Aktivität, benannt wurden (Anderson *et al.*, 2002, Andrews *et al.*, 1988, Banerji & Flieger, 2004, Kienesberger *et al.*, 2009, Shewry, 2003). Enzyme dieser Familie weisen vier konservierte Sequenzblöcke auf, wobei im Block II das Ser des aktiven Zentrums innerhalb des Gly-X-Ser-X-Gly Motives und im Block IV das Asp der katalytischen Diade innerhalb eines Asp-Gly Motives eingebettet ist. Sowohl die Diade als auch ein Abschnitt von Gly-Resten nahe des N-Terminus im Block I sind einzigartig und charakteristisch für bakterielle Lipasen (Banerji & Flieger, 2004, Hirschberg *et al.*, 2001, Rydel *et al.*, 2003, Schrag & Cygler, 1996). Im Block III befindet sich ein weiteres Motiv mit einem konservierten Prolin (Pro), welches sich aber im Vergleich zu den eukaryotischen PLPs unterscheidet. Die bakteriellen PLPs weisen im Vergleich zum eukaryotischen Ala-Ala-Pro an dieser Stelle ein Ala-Ser-X-X-X-Pro Motiv auf (Banerji & Flieger, 2004, Hirschberg *et al.*, 2001). Gegenwärtig sind mehr als 20.000 Proteine innerhalb der

bakteriellen Genome bekannt, die diese Patatin/Phospholipase A₂-verwandte Domäne besitzen (<http://www.ebi.ac.uk/interpro>). Neben dem bestcharakterisierten Vertreter dieser Familie mit erst kürzlich bekannt gewordener Kristallstruktur, ExoU aus *Pseudomonas aeruginosa*, (Banerji & Flieger, 2004, Gendrin *et al.*, 2012, Phillips *et al.*, 2003, Sato & Frank, 2004, Sato *et al.*, 2003), sind nur wenige bakterielle PLPs näher untersucht worden. Dazu gehören das PlpD aus *P. aeruginosa*, YvdO aus *Bacillus subtilis* sowie VipD/PatA, VpdA/PatC, VpdB/PatG, VpdC/PatF und PatD aus *L. pneumophila* (s. 1.5.1) (Aurass *et al.*, 2009, Kato *et al.*, 2009, Ku *et al.*, 2012, Salacha *et al.*, 2010, Shohdy *et al.*, 2005, VanRheenen *et al.*, 2006, Gaspar & Machner, 2014).

Eine weitere Gruppe bakterieller lipolytischer Enzyme wurde nach dem ersten entdeckten Mitglied, PlaB, aus *L. pneumophila* benannt (Bender *et al.*, 2009). Das *plaB*-Gen wurde während eines Screenings hämolytischer *Escherichia coli* Klone, welche eine *L. pneumophila* Genbibliothek exprimierten, identifiziert. Neben der eben genannten hämolytischen Aktivität zeigte dieses Enzym auch PLA- und LPLA-Aktivitäten. Bisher wurden keine signifikanten Homologien zu bisher bekannten Phospholipasen/Lipasen, sondern nur zu hypothetischen Proteinen wasserassoziierter Bakterien beschrieben (Flieger *et al.*, 2004). PlaB besitzt die typische Ser-Asp-His katalytische Triade, die in ein bis dato noch unbekanntes Konsensus-Motiv innerhalb des N-terminalen Bereiches eingebettet ist. Das Ser des aktiven Zentrums befindet sich dabei in einem ungewöhnlichen Thr-X-Ser-X-Gly Motiv. Zudem sind die katalytisch aktiven Aminosäurereste Asp und His in einem atypischen Gly-Ser-Asp-Gly-Val-Val bzw. in einem Ser-His-Ser Motiv lokalisiert (Bender *et al.*, 2009, Flieger *et al.*, 2004). Auf das im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Protein wird zudem im Kapitel 1.5 näher eingegangen.

1.4.2 Rolle der bakteriellen Phospholipasen in der Virulenz

Phospholipasen mit experimentell bestätigter und putativer Funktion als Virulenzfaktor konnten sowohl in intrazellulären aber auch in extrazellulären Bakterien identifiziert werden. Zu diesen zählen unter anderem verschiedene *Clostridium* und *Bacillus* Spezies, *L. monocytogenes*, *P. aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Salmonella enterica*, *Helicobacter pylori*, *Yersinia enterocolitica* und *L. pneumophila*. Die verschiedenen Phospholipasen spielen dabei eine wesentliche Rolle in der Pathogenität und sind somit in verschiedene krankheitsfördernde Prozesse involviert (Higgins *et al.*, 1989, Istivan & Coloe, 2006, Popoff & Bouvet, 2009, Schmiel & Miller, 1999, Singh *et al.*, 2010, Sitkiewicz *et al.*, 2007, Songer, 1997, Titball, 1998, Titball, 1993). Grundsätzlich können diese virulenzfördernden Abläufe in zwei Kategorien eingeteilt werden. Zum einen gibt es die Phospholipaseaktivitäten, welche ihre Wirkung über zytolytische bzw. destruktive Eigenschaften

entfalten und dabei Membranstrukturen zerstören. Zum anderen gibt es Phospholipaseaktivitäten, die die Wirtszelle über Signaltransduktionsprozesse manipulieren (s. Abb. 1.3) (Kuhle & Flieger, 2014).

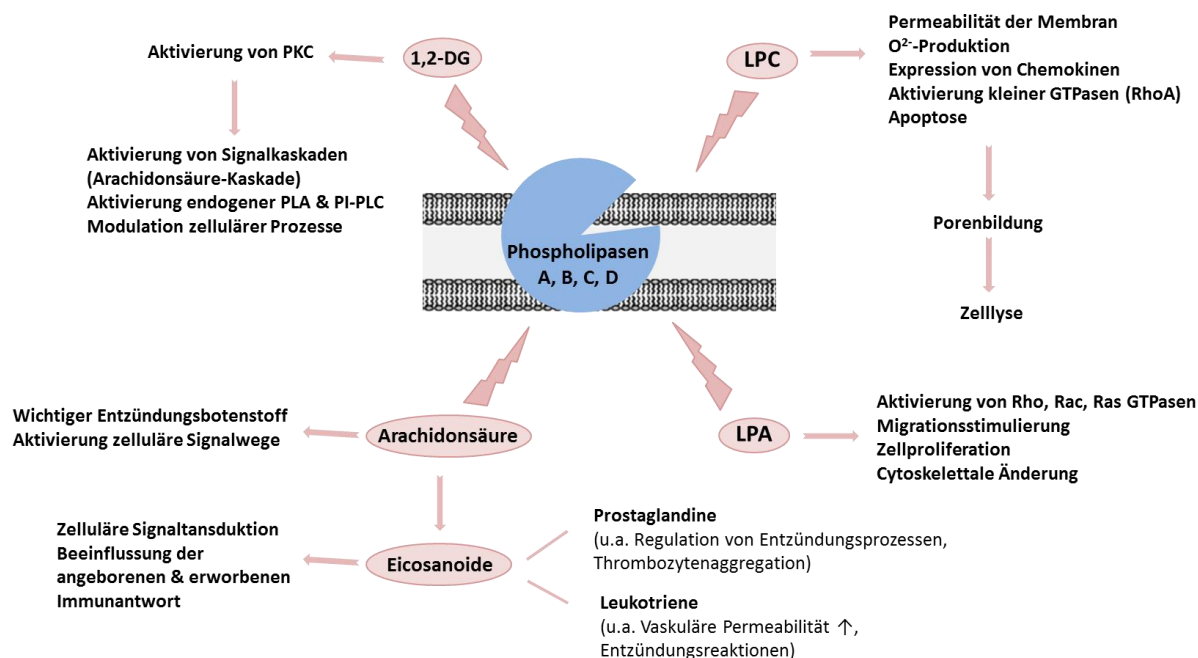


Abb. 1.3: Überblick über den möglichen Einfluss bakterieller Phospholipasen auf die Wirtszelle. Phospholipasen können zum einen direkt Membranen schädigen und somit Zelllyse verursachen. Zum anderen spielen die durch Phospholipaseaktivität generierten sekundären Botenstoffe, wie das 1,2-Diacylglycerol (1,2-DG), Lysophosphatidylcholin (LPC), Lysophosphatidsäure (LPA) und die freie Fettsäure Arachidonsäure eine wesentliche Rolle bei der Manipulation von Wirtszell-Signalkaskaden sowie bei der Beeinflussung inflammatorischer Vorgänge oder beim Prozess der Apoptose. Die Aktivierung der Arachidonsäure-Kaskade führt z.B. zur Produktion intrazellulärer Mediatoren, wie den Leukotrienen und Prostaglandinen, was wiederum Entzündungsreaktionen auslöst. Daneben können wirtseigene Enzyme, wie die Proteinkinase C (PKC) aktiviert werden, was zur Modulation zellulärer Funktionen durch die Aktivierung proinflammatorischer Gene führt.

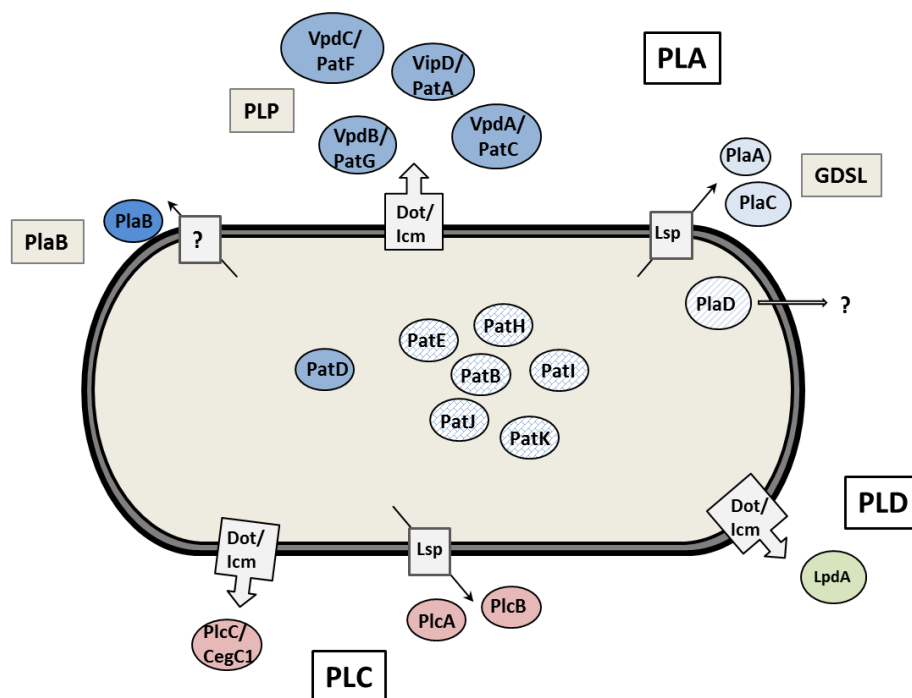
Die Toxizität bakterieller Phospholipasen ist oftmals mit ihrem zytolytischen Potential verbunden. Die dabei stattfindende Hydrolyse von Phospholipiden kann entweder durch die bakterielle Phospholipase selbst oder durch andere degradierende Wirtszellenzyme verursacht werden. Der damit einhergehende Abbau struktureller Lipide, die Generierung lytischer bzw. membranverändernder Reaktionsprodukte, wie z.B. das bereits erwähnte LPC, oder eine Änderung der Membranzusammensetzung resultieren in einer Zerstörung der Integrität von Zellstrukturen/Zellmembranen und demzufolge in Zelltoxizität (Schmiel & Miller, 1999, Weltzien, 1979). Der extrazelluläre Lungenerreger *P. aeruginosa* injiziert ExoU, eine PLP mit PLA- sowie LPLA-Aktivität und einem breiten Substratspektrum, direkt in die Wirtszelle über das Typ III-Sekretionssystem. Die dabei induzierten zytotoxischen Effekte ziehen einen nekrotischen Zelltod als Konsequenz der Membranzerstörung nach sich (Finck-Barbançon *et al.*,

1997, Saliba *et al.*, 2006, Sato & Frank, 2004, Sato *et al.*, 2003, Tamura *et al.*, 2004). Die Zerstörung der Epithel- sowie Endothelbarriere ermöglicht *P. aeruginosa* eine Dissemination im Blutstrom (Hauser, 2009). Phospholipasen können aber auch eine Bakterien-induzierte Membranverlängerung hervorrufen. *S. Typhimurium* besitzt z.B. ein GDSL-Enzym, SseJ, mit PLA- und GCAT-Aktivitäten. Dieses Effektorprotein reguliert den Grad der tubulären Extensionen von der *Salmonella*-beinhaltenden Vakuole (SCV), den sogenannten Sifs (*Salmonella*-induzierte Filamente). SseJ ist dabei nach seiner Injektion über das Typ III-Sekretionssystem an der SCV-Membran bzw. den Sifs lokalisiert und wirkt dem stimulierenden Effekt von SifA, einem essentiellen Protein für die Sif-Bildung, entgegen (Lossi *et al.*, 2008, Ruiz-Albert *et al.*, 2002).

Die bei den Phospholipaseaktivitäten generierten sekundären Botenstoffe, wie z.B. LPC, Arachidonsäure (freie Fettsäure), Lysophosphatidsäure (LPA) und 1,2-DG spielen bei der Manipulation bzw. Interferenz von Wirtszell-Signalkaskaden und Modulation entzündlicher Prozesse eine wesentliche Rolle (Abb. 1.3) (Dennis *et al.*, 1991, Lang & Flieger, 2011, Kuhle & Flieger, 2014). Das bei der PC-Hydrolyse freigesetzte LPC weist dabei eine Vielzahl von Funktionen in eukaryotischen Zellen auf. Es steigert z.B. die Produktion von Superoxid-Anionen ($O_2^{\cdot-}$) durch Aktivierung des NADH/NADPH-Oxidase-Systems, die Expression von Chemokinen, wie Interleukin-8, und aktiviert die kleine GTPase RhoA in einer Proteinkinase C (PKC) α -abhängigen Weise. In diesem Zuge werden die Permeabilität des Endothels beeinflusst und die Apoptose sowie Entzündungsprozesse vermittelt (Huang *et al.*, 2005, Masamune *et al.*, 2001, Murugesan *et al.*, 2003, Takeshita *et al.*, 1999). 1,2-DG, das Reaktionsprodukt der PLCs, reguliert eine Reihe von zellulären Prozessen über die Aktivierung von PKC und verschiedenen Signaltransduktionskaskaden (Newton *et al.*, 2010, Oliva *et al.*, 2005). Das Reaktionsprodukt LPA kann zum einen über PA durch PLA₁- und PLA₂-Aktivitäten oder über PLD-vermittelte Hydrolyse von Lysophospholipiden generiert werden. Dieses Signalmolekül aktiviert Signalkaskaden über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, wie die der GTPasen Ras, Rac sowie Rho und verändert damit verschiedene zelluläre Antworten in Bezug auf Zellproliferation, Überleben, Migration aber auch Änderungen des Zytoskelettes sowie die Sekretion von Chemokinen und Zytokinen (Lin *et al.*, 2010, Moolenaar *et al.*, 2004, van Leeuwen *et al.*, 2003, Zhao & Natarajan, 2013).

Neben den zytolytischen Eigenschaften wurde für ExoU ebenso die zweite Kategorie der virulenzfördernden Prozesse, die Manipulation des Wirts, beschrieben. Diese *P. aeruginosa* PLP ist zu einer eukaryotischen cPLA₂ homolog und löst *in vivo* eine Arachidonsäure-abhängige Entzündungskaskade aus. Dadurch wird die Produktion proinflammatorischer Eicosanoide und spezifischer Transkriptionsfaktoren induziert, die wiederum die Zytokin-Produktion regulieren,

Phospholipasen bakterieller Pathogene unterstützen eine Reihe von Degradations- und Modulationsprozessen im Wirt. Der intrazelluläre Lungenerreger *L. pneumophila* exprimiert eine Vielfalt dieser Enzyme, welche potentiell an krankheitsfördernden Prozessen und an der Entwicklung einer Pneumonie beteiligt sein können. Bislang wurden 15 Gene in *L. pneumophila* identifiziert, die für putative PLAs kodieren. Diese können den drei verschiedenen Familien GDSL-Hydrolasen, der PLP- sowie der PlaB-Familie zugeordnet werden (Banerji *et al.*, 2008, Lang & Flieger, 2011). Des Weiteren sind die drei PLCs, PlcA, PlcB und PlcC/CegC1 (Aragon *et al.*, 2002, Aurass *et al.*, 2013, McCoy-Simandle *et al.*, 2011) sowie die PLD LpdA (Viner *et al.*, 2012) bekannt (s. Abb. 1.4). Davon wurden nur wenige allein in *L. pneumophila* detektiert, wie VipD/PatA, PlcA und LpdA (Aurass *et al.*, 2013, Viner *et al.*, 2012, Lang & Flieger, 2011). Meistens existieren Paraloge der Phospholipasen in anderen *Legionella*-Spezies, wie z.B. *L. drancurtii* oder *L. longbeachae* (Cazalet *et al.*, 2010, Kozak *et al.*, 2010, Moliner *et al.*, 2009).



17

Die folgenden Abschnitte geben einen Überblick über die *Legionella*-PLAs, insbesondere über die Substratspezifität, Sekretion, Expression und ihren Einfluss auf die Wirtszelle.

1.5.1 Phospholipasen A der GDSL-Hydrolasen, PlaB- und PLP-Familie

Die drei GDSL-Hydrolasen PlaA, PlaC und PlaD sind homolog zu dem schon erwähnten SatA-Enzym aus *A. salmonicida* und besitzen daher ebenso die fünf typischen Homologie-Blöcke dieser Lipasefamilie (s. 1.4.1) (Banerji *et al.*, 2008, Lang *et al.*, 2012). PlaA ist das erste charakterisierte Mitglied der *L. pneumophila* GDSL-Hydrolasen und wurde mittels N-terminaler Sequenzierung einer aus dem *Legionella*-Kulturüberstand gereinigten LPLA identifiziert (Flieger *et al.*, 2001). Experimente zur Bestimmung der Enzymaktivitäten implizierten, dass PlaA die bedeutendste sekretierte LPLA mit zusätzlicher PLA- und Lipaseaktivität in *L. pneumophila* darstellt. Da der Überstand der *plaA*-Mutante nach wie vor starke PLA- und schwache LPLA-Aktivitäten aufwies, wurden weitere sekretierte PLAs bzw. LPLAs in *L. pneumophila* vermutet (Flieger *et al.*, 2002). Die eng verwandte GDSL-Hydrolase von PlaA, PlaC, besitzt vorwiegend PLA- und weniger LPLA-Aktivitäten mit zusätzlicher GCAT-Aktivität (Banerji *et al.*, 2005, Flieger *et al.*, 2002). PlaC wird als bedeutendstes GCAT-Enzym mit PLA- und LPLA-Aktivitäten im Kulturüberstand von *L. pneumophila* beschrieben (Banerji *et al.*, 2005, Lang *et al.*, 2012). Erst kürzlich wurde demonstriert, dass PlaC Fettsäureketten nicht nur auf Cholesterol, sondern ebenso auf Ergosterol übertragen kann, ein Membranlipid der Pilze, Protozoen und Mikroalgen (Lang *et al.*, 2012, Raederstorff & Rohmer, 1985, Volkman, 2003). Neben PlaC tragen die zwei anderen GDSL-Enzyme, PlaA und PlaD, auch zur Acylierung von Sterolen bei (Lang *et al.*, 2012). Zur Aktivierung der GCAT-Aktivität von PlaC ist ein Faktor aus dem Kulturüberstand von *L. pneumophila* nötig, die Zink-Metalloproteinase ProA (Banerji *et al.*, 2005, Lang *et al.*, 2012), welche PlaC direkt über das Abspalten einer Peptidregion zwischen zwei Disulfid-Brücken prozessiert (Lang *et al.*, 2012). Mutagenese-Studien belegten zudem, dass Ser₃₇, Asp₃₉₈ und His₄₀₁ die typische katalytische Triade in PlaC ausbilden (Lang *et al.*, 2012). Über das dritte Mitglied der GDSL-Lipasefamilie, PlaD, ist nur sehr wenig bekannt. Im Vergleich zu PlaC und PlaA besitzt PlaD hinter dem letzten Homologie-Block eine C-terminale Verlängerung von etwa 170 Aminosäuren, deren Funktion noch nicht charakterisiert ist (Banerji *et al.*, 2008). PlaD weist neben der LPLA-Aktivität auch PLA- und Acyltransferaseaktivität auf. Im Gegensatz zu PlaC wird bei der Zugabe von ProA die GCAT-Aktivität reduziert (Lang *et al.*, 2012).

Bezüglich der Sekretion deuten bisherige Sekretom- und Aktivitätsanalysen darauf hin, dass PlaA und PlaC TypII-abhängig sekretiert werden (Aragon *et al.*, 2002, Banerji *et al.*, 2005, DebRoy *et al.*, 2006, Flieger *et al.*, 2001, Flieger *et al.*, 2002, Rossier & Cianciotto, 2001, Rossier & Cianciotto, 2005). Zudem besitzen diese beiden Enzyme, im Gegensatz zu PlaD, ein N-terminales

Signalpeptid (Banerji *et al.*, 2008, Banerji *et al.*, 2005). PlaC wurde des Weiteren mit Vesikeln der äußeren Membran assoziiert gefunden (Galka *et al.*, 2008). Mikroarray-Analysen, welche das Expressionsprofil während einer *A. castellanii*-Infektion und dem Wachstum in Boullion verglichen, deuteten darauf hin, dass *plaC* und *plaD* hochreguliert waren. Im Vergleich dazu ist die *plaA*-Expression während der Infektion hochreguliert, aber in Boullion herunterreguliert (Brüggemann *et al.*, 2006, Weissenmayer *et al.*, 2011).

In den Genom-sequenzierten Stämmen von *L. pneumophila* konnten insgesamt 11 Proteine der PLP-Familie zugeordnet werden, VipD/PatA, PatB, VpdA/PatC, PatD, PatE, VpdC/PatF, VpdB/PatG, PatH bis PatK (s. Abb. 1.4) (Aurass *et al.*, 2009, Banerji *et al.*, 2008, Lang & Flieger, 2011, Shohdy *et al.*, 2005, VanRheenen *et al.*, 2006). Demnach ist *L. pneumophila* das Bakterium mit der größten Dichte an PLP-Genen bezogen auf die Gesamtheit der Protein-kodierenden Sequenzen (Banerji & Flieger, 2004). Das am besten charakterisierte Mitglied dieser Lipasefamilie, VipD/PatA, wurde bei dem Screening einer *L. pneumophila* Genbibliothek auf einen Defekt in der vakuolären Proteinsortierung (VPS, *vacuole protein sorting*) in Hefe entdeckt (Shohdy *et al.*, 2005). Erst kürzlich ist es gelungen, die Kristallstruktur des Proteins zu lösen. Es konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, dass der C-Terminus von VipD mit zwei Regulatoren des endosomalen Vesikeltransportes, Rab5 und Rab22, interagiert und somit regulierend in diesen Transportweg eingreift (Ku *et al.*, 2012, Gaspar & Machner, 2014). Die Expression von VipD zeigt jedoch keine toxischen Auswirkungen auf Hefe im Vergleich zu seinem zytotoxischen Homolog ExoU aus *P. aeruginosa* (Finck-Barbançon *et al.*, 1997, Sato *et al.*, 2003, Shohdy *et al.*, 2005, VanRheenen *et al.*, 2006). Nur eine Überexpression von VipD in Hefe verursacht ein schlechteres Wachstum des Einzellers (Heidtman *et al.*, 2009, VanRheenen *et al.*, 2006, Viner *et al.*, 2012). Des Weiteren heben Mutationen der zwei konservierten Aminosäuren innerhalb der PLPs, Ser₇₃ und Asp₂₈₈, die PLA-Aktivität von VipD auf, was auf die typische katalytische Diade schließen lässt (Ku *et al.*, 2012). Über die drei nächsten Homologen von VipD, VpdA, VpdB sowie VpdC ist nur wenig bekannt. Im Gegensatz zu den zwei Erstgenannten, die ein ähnliches Molekulargewicht (MG) wie VipD besitzen, weist VpdC eine N-terminale Verlängerung von mehr als 200 Aminosäuren auf (VanRheenen *et al.*, 2006). Zudem induziert die Expression von *vpdA* und *vpdC* in Hefe einen letalen Effekt (Heidtman *et al.*, 2009, Viner *et al.*, 2012). VpdA verursacht, ebenso wie VipD, sekretorische Defekte in Hefe (Heidtman *et al.*, 2009). Ein weiteres Mitglied der PLP-Familie, PatD, ist als eine zellassoziierte PLA/LPLA in *Legionella* bekannt und trägt zu etwa 40% der gesamten lipolytischen Aktivität bei (Aurass *et al.*, 2009). Das in einem Operon organisierte *patD* ist vermutlich an dem Polyhydroxybutyrat (PHB)-Metabolismus beteiligt, da eine *Legionella patD-bdhA*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp

eine gesteigerte Anzahl an PHB-Granula aufwies. Zudem besitzt PatD eine strukturelle Ähnlichkeit zu einer PHB-Depolymerase (Aurass *et al.*, 2009, Papageorgiou *et al.*, 2008, Rydel *et al.*, 2003).

Wie aus Abbildung 1.4 hervorgeht, ist die Lokalisation bzw. Sekretion nur von einigen PLP-Enzymen bekannt. PatD ist ein zellassoziertes Protein, dessen genaue Lokalisation innerhalb von *Legionella* noch nicht beschrieben wurde (Aurass *et al.*, 2009). VipD, VpdA, VpdB sowie VpdC werden dagegen über das Dot/Icm Typ IVB-Sekretionssystem transloziert (Shohdy *et al.*, 2005, VanRheenen *et al.*, 2006, Zhu *et al.*, 2011). Zudem konnte demonstriert werden, dass VipD an frühen Endosomen lokalisiert ist (Ku *et al.*, 2012). Mikroarray-Analysen einer *A. castellanii*-Infektion zeigten, dass die Mitglieder der PLP-Lipasefamilie ein unterschiedliches Expressionsmuster in *L. pneumophila* aufweisen (Brüggemann *et al.*, 2006, Weissenmayer *et al.*, 2011). Es scheint, als ob diese Enzyme sowohl in der späten Phase des intrazellulären Wachstums, als auch für den Start eines neuen Infektionszyklus von Bedeutung sind (Kuhle & Flieger, 2014).

Die dritte bekannte Lipasefamilie in *Legionella* erhielt ihren Namen von dem ersten beschriebenen Mitglied PlaB. Diese bedeutende zellassozierte PLA/LPLA mit zusätzlicher hämolyscher Aktivität besitzt keine Homologien zu bisher bekannten Phospholipasen (Bender *et al.*, 2009, Flieger *et al.*, 2004). Es konnte nur eine sehr geringe Proteinähnlichkeit (26% Identität, 29% Ähnlichkeit) zu der bekannten sekretierten Lipase LipB aus *L. pneumophila* festgestellt werden (Aragon *et al.*, 2002, Flieger *et al.*, 2004, BlastP). Des Weiteren liegen ebenso Paralogue von *plaB* in anderen *Legionella*-Spezies konserviert vor, wie z.B. in *L. longbeachae*, *L. bozemanii*, *L. drancourtii*, *L. gormanii* und *L. spiritensis*. Die zwei letztgenannten Spezies zeigen vergleichbare PLA/LPLA-Aktivitäten zu *L. pneumophila*. Jedoch ist die PC-assozierte PLA-Aktivität in *L. pneumophila* am stärksten ausgeprägt (Bender *et al.*, 2009). PlaB präferiert neben PC ebenso PG und die zugehörigen Lysophospholipide mit langkettigen Fettsäuren als Substrate und weist im Vergleich zu den sekretierten PLA/LPLA-Aktivitäten in *L. pneumophila* eine 100fach stärkere Enzymaktivität auf (Bender *et al.*, 2009, Flieger *et al.*, 2004). Ortsgerichtete Mutagenese-Studien konnten zudem das katalytische Zentrum mit der typischen Triade aus Ser₈₁, Asp₂₀₃ und His₂₅₁ aufdecken, welche in einem ungewöhnlichen Sequenzmotiv eingebettet sind (Bender *et al.*, 2009) (s. auch 1.4.1). Des Weiteren haben die Aminosäuren His₇, Ser₁₂₉ und Thr₈₃ einen Einfluss auf die Substratspezifität. In diesem Zusammenhang konnte zudem die direkte Verbindung zwischen PC-Hydrolyse und hämolyscher Aktivität ermittelt werden (Bender *et al.*, 2009). PlaB hydrolysiert typische eukaryotische Phospholipide, wie z.B. PC und PS. Darüber hinaus weist es die stärkste PLA-Aktivität in *L. pneumophila* auf, welche für eine Wirtsinfektion

entscheidend sein kann. Interessanterweise besitzen PlaB-Paraloga, wie z.B. aus *L. spiritensis*, einer nicht krankheitsassoziierten Spezies (Fang *et al.*, 1989, Muder & Victor, 2002), weniger PC-assoziierte und nur 50% der hämolytischen Aktivität im Vergleich zum pathogenen *L. pneumophila* Stamm (Bender *et al.*, 2009, Kuhle & Flieger, 2014).

Obwohl die zellassoziierte PLA/LPLA-Aktivität von PlaB während einer Amöben- und Humanzellen-Infektion mit *L. pneumophila* detektiert werden kann (Bender *et al.*, 2009), zeigten Microarray-Analysen keine signifikanten Änderungen in der *plaB*-Expression während einer Amöben-Infektion (Brüggemann *et al.*, 2006, Weissenmayer *et al.*, 2011). Vermutlich wird die Expression von *plaB* während der frühen Phase der Infektion induziert und das mRNA-Niveau während eines Infektionszyklus konstant gehalten (Kuhle & Flieger, 2014). In Bouillon ist die *plaB*-Expression während der frühen exponentiellen Phase markant und nimmt mit Eintritt in die transmissive Phase wieder ab (Schunder *et al.*, 2010, Weissenmayer *et al.*, 2011). Allerdings ist die korrespondierende hämolytische und PC-assoziierte PLA-Aktivität vor allem während der späten exponentiellen Phase detektiert worden (Schunder *et al.*, 2010).

Die oberflächenassoziierte Lokalisation von PlaB wurde bisher nur anhand von Aktivitätsstudien in Verbindung mit Zellfraktionierung und Proteinase K-Experimenten mit ganzen Zellen gezeigt (Schunder *et al.*, 2010).

1.5.2 Bedeutung der Phospholipasen A für *L. pneumophila*

Phospholipasen stellen typische Virulenzfaktoren bakterieller Erreger dar. Im Fall von *L. pneumophila* können sie das intrazelluläre Überleben und den Austritt aus der LCV fördern.

Die GDSL-Hydrolase PlaA z.B. führt zur Zerstörung der Vakuole, vermutlich durch direkten Angriff der Membranlipide, und somit zum Tod der Wirtszelle (Creasey & Isberg, 2012). Die beiden Phospholipide PC und PG sind Bestandteile der Wirtszellmembranen aber auch des Lungensurfactants und können effizient durch spezifische *Legionella*-PLAs zu Lysophospholipiden und FFA hydrolysiert werden. Die LPLA-Aktivitäten können wiederum das entstandene toxische LPC, ein Signalmolekül und porenförderndes Agens, abbauen (Weltzien, 1979, Prokazova *et al.*, 1998). Eine präzise Regulierung dieser GDSL-Enzymaktivitäten könnte somit das Überleben von *Legionella* im Wirt unterstützen. Zudem könnte auch das Überleben der Wirtszelle gefördert werden, was eine Integrität des Bakteriums bis zum Ende des Infektionszyklus garantieren würde (Kuhle & Flieger, 2014). Die detoxifizierende Wirkung der LPLA-Aktivität konnte für das GDSL-Enzym PlaA nachgewiesen werden (Flieger *et al.*, 2002).

Des Weiteren könnte die Freisetzung von Fettsäuren, aber auch die Übertragung der FFA an Akzeptormoleküle, wie z.B. Cholesterol, sowie die Bildung von LPC die Signalwege im Wirt beeinflussen. PlaC ist in diesem Zusammenhang als sekretierte GDSL-Hydrolase bekannt, die

solche GCAT-Aktivität besitzt (Lang *et al.*, 2012). PlaA und PlaD könnten ebenso gut zur Acylierung von Sterolen unter *in vivo* Bedingungen beitragen, wie es schon für Ergosterol als Akzeptormolekül gezeigt wurde. Diese GCAT-Aktivität kann eukaryotische Membranen modifizieren und somit die Zusammensetzung und Rezeptorpräsentation beeinflussen (Banerji *et al.*, 2005, Ruiz-Albert *et al.*, 2002).

Die übrigen der 15 bekannten PLAs können ebenso mit ihren Aktivitäten die Wirtszelle manipulieren. Für eine *plaB*-Mutante konnte im *in vivo* Meerschweinchen-Infektionsmodell gezeigt werden, dass diese eine verminderte Replikation in der Lunge sowie eine verminderte Dissemination in andere Organe wie die Milz aufwies. Weiterhin wurden eine deutliche Zerstörung des Lungengewebes und Anzeichen von Entzündungsreaktionen in Verbindung mit *L. pneumophila* Wildtyp-Infektionen festgestellt, welche bezüglich der *plaB*-Mutante nur kaum wahrnehmbar waren. Diese Beobachtungen verdeutlichen das zytolytische Potential von PlaB, welches möglicherweise die Ausbreitung in andere Organe positiv beeinflusst (Schunder *et al.*, 2010). Die PLPs VipD und VpdA wurden unter anderem als Proteine in Hefe identifiziert, die den Transport von Wirtsproteinen zur Vakuole hemmen (Heidtman *et al.*, 2009). Wie bereits erwähnt wurde, blockiert VipD den endosomalen Verkehr in Makrophagen über die Interaktion mit zwei Regulatorproteinen (Ku *et al.*, 2012, Gaspar & Machner, 2014).

L. pneumophila besitzt eine Vielzahl von Proteinen, die für den eigenen Vorteil durch die Modulation zellulärer Funktionen des Wirtes genutzt werden können, wozu auch die bereits beschriebenen PLAs zählen. Zusammen mit den drei PLCs und der PLD stellen sie ein reiches Repertoire für *L. pneumophila* dar, um die Wirtszellmembran anzugreifen und sekundäre Botenstoffe zu generieren, wie z.B. LPC, ein wichtiger Mediator für Apoptose und Entzündungsprozesse (Linkous & Yazlovitskaya, 2010, Murugesan *et al.*, 2003, Takahashi *et al.*, 2002). Daneben ist die GCAT-Aktivität ein wichtiges Werkzeug zur Veränderung der Wirtszelle. Die Zerstörung der Phospholipide im Lungensurfactant ist ein weiterer essentieller Virulenzmechanismus für die Phospholipasen von *Legionella*, der zu Komplikationen beim Patienten sowie der Entwicklung einer Pneumonie während einer Infektion mit Legionellen beitragen kann (Flieger *et al.*, 2000).

1.6 Zielstellung

Der intrazelluläre Lungenerreger *L. pneumophila* exprimiert eine Vielzahl von Phospholipasen, die in krankheitsfördernde Prozesse eingreifen sowie an der Entwicklung einer Pneumonie beteiligt sein können. Neben einer bekannten PLD und drei PLCs kodiert das Bakterium für 15 PLAs, die den drei Lipasefamilien GDSL-Hydrolasen, PLP und PlaB zugeordnet werden können. Die zellassozierte PLA/LPLA mit zusätzlicher hämolytischer Aktivität ist das erste und bisher einzig beschriebene Mitglied der erst kürzlich entdeckten PlaB-Familie (Bender *et al.*, 2009). Im Vergleich zu den GDSL-Enzymen zeigt PlaB keine Homologien zu eukaryotischen Proteinen, sondern nur zu hypothetischen Proteinen wasserassoziierter Bakterien. PlaB besitzt die stärkste PLA- sowie LPLA-Aktivität. Im Vergleich zu den sekretierten PLAs ist diese 100fach stärker ausgeprägt (Bender *et al.*, 2009, Flieger *et al.*, 2004). Das katalytisch aktive Zentrum bestehend aus Ser-Asp-His konnte im N-terminalen Bereich des Proteins identifiziert werden (Bender *et al.*, 2009). Jedoch ist die Funktion des C-terminalen Bereiches von etwa 170 Aminosäuren noch unbekannt. Studien mit C-terminal verkürzten Varianten des Proteins zeigten, dass die letzten 15 Aminosäuren wichtig für die enzymatische Aktivität sind (Bender *et al.*, 2009). Im Rahmen dieser Arbeit war es daher von Interesse, das Wissen um die zellassozierte Phospholipase A PlaB mittels biochemischer und struktureller Versuchsansätze zu erweitern.

Im Zuge der biochemischen Charakterisierung des Enzyms sollte die Bedeutung des C-Terminus für die enzymatische Aktivität mittels Mutagenese-Studien analysiert werden. Die verschiedenen generierten Mutanten sollten anschließend im Hinblick auf ihre phospholipolytische Aktivität hin untersucht werden.

Des Weiteren sollte PlaB, für die bessere Charakterisierung hinsichtlich biochemischer als auch struktureller Eigenschaften, in reiner und aktiver Form gewonnen werden.

Für den Aspekt der strukturellen Charakterisierung sollte der Oligomerisierungsgrad des Proteins mittels verschiedener Methoden, wie z.B. Röntgenkleinwinkelstreuung, Größenausschlusschromatographie, chemischer Quervernetzung, Massenspektrometrie und analytischer Ultrazentrifugation, bestimmt werden. Zudem sollte der Einfluss der letzten 15 Aminosäuren, welche wichtig für die enzymatische Aktivität sind, auf den Oligomerisierungsgrad analysiert werden. Ob der Oligomerisierungsgrad die enzymatische Aktivität von PlaB beeinflusst, wie es bei der *outer membrane phospholipase A* (OMPLA) aus *E. coli* beobachtet wurde, sollte in diesem Zusammenhang ebenfalls untersucht werden.

Des Weiteren war es von Interesse, einen funktionellen Antikörper gegen PlaB zu generieren, um anschließend Expressions-, Lokalisations- und Exportanalysen in *Legionella* durchzuführen. Zum einen sollten diesbezüglich zur Verfügung stehende Sekretionsmutanten vom Typ I, Typ II, Typ IVA, Typ IVB und Tat und zum anderen N- und C-terminal verkürzte PlaB-Mutanten für die

Sekretionsstudien untersucht werden. Mittels zellulärer Fraktionierung sowie Biotinylierung und Proteinase K-Zugänglichkeit oberflächenassoziierter Proteine sollte die Lokalisation von PlaB verifiziert werden.

Abschließend galt es die Frage zu beantworten, ob PlaB die Zusammensetzung der Membranlipide von *L. pneumophila* als mögliche biologische Funktion beeinflusst.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Software

Tab. 2.1: verwendete Software und Internetdatenbanken

Datenbank	Adresse
ClustalW2	https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/
mericity	http://www.mericity.com
NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov
Phyre2	http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2
Oligo Analyzer 3.1	http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/
ProtParam	http://web.expasy.org/protparam/
HMMTOP	http://www.enzim.hu/hmmtop/
TMHMM	http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/
PSORT	http://www.psort.org/psortb/index.html
SignalP 4.1	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/
Phobius	http://phobius.sbc.su.se/
TatP 1.0	http://www.cbs.dtu.dk/services/TatP/
PrediSi	http://www.predisi.de/
COILS Server	http://embnet.vital-it.ch/software/COILS_form.html
Predictors	http://gpcr.biocomp.unibo.it/cgi/predictors/cc/pred_cchmm.cgi
PSLPred	http://www.imtech.res.in/raghava/pslpred/
PrePS	http://mendel.imp.ac.at/sat/PrePS/index.html
LipoP	http://www.cbs.dtu.dk/services/LipoP/
Programme	Hersteller
Acolyte (Koloniezählprogramm)	Synbiosis
ImageJ	http://rsb.info.nih.gov/ij
Lasergene 10	DNASTAR, Inc.
Magellan V5.03	Tecan
Quantity One	Bio-Rad
NIS-Elements AR 3.2	Nikon
Chemi-Capt 3000	Vilber Lourmat
UNICORN (ÄKTAexplorer)	GE Healthcare

2.1.2 Technische Laborausstattung

Tab. 2.2: verwendete Geräte

Geräte	Typ	Hersteller
Absorptionsmessgerät für Mikrotiterplatten	Tecan Sunrise	Tecan
Brutschrank	Functionline B 20	Thermo / Heraeus
Chemilumineszenzimager	Chemi-Smart 3000	Vilber Lourmat
Rotator	neoLab-Rotator 2-1175	neoLab
Dünnschichtkammer	DC-Glastank (Maße: 35×25×12 cm)	Desaga
Elektroporationsgerät	Cell Porator	Life Technologies
FPLC	a) ÄKTAprime b) ÄKTAexplorer	GE Healthcare (Amersham Bioscience)
Gelelektrophorese-System	Gelkammer (Mini) SubCell GT Spannungsgerät PowerPack 300 Mini Protean 3	Bio-Rad
Heizschüttler	Thermomixer Comfort	Eppendorf
Homogenisator	Emulsiflex C3	Avestin

Inkubatoren	a) InnovaTM 4230 b) InnovaTM 43 c) TH25	New Brunswick Scientific Edmund Bühler
Kamera	Spiegelreflexkamera	Nikon
Koloniezählgerät	Acolyte	Synbiosis
Mikroskop	Nikon Eclipse Ti (cLSM)	Nikon
pH-Elektrode	Toledo MP225 pH Meter	Mettler
PCR-Cycler	a) FlexCycler b) Thermocycler T-Gradient	Analytik Jena Biometra
Plattiergerät	Eddy Jet	IUL Instruments
Schlauchpumpe	Peristaltische Pumpe P-1	GE Healthcare
Semidry-Elektroblotter	TE77	Pharmacia
Mikrobiologische Sicherheitswerkbank	HERAsafe HS	Thermo scientific
Tisch-Schüttler	a) WT12 b) S410 c) Unimax 1010 (in Inkubator TH25)	Biometra mLw Heidolph
Tisch-Zentrifuge	Eppendorf Zentrifuge 5415 R	Eppendorf
Ultraschallgerät	a) Branson Digital Sonifier b) Bandolin Sonorex Super RK 103 H	Branson Bandolin
UV/VIS Spektrophotometer	a) NanoDrop® ND-1000 b) DU®720 Spectrophotometer	NanoDrop Beckman Coulter
UV-Transiluminator	Gel Doc 2000	Bio-Rad
Vortexer	Vortex Mixer 7-2020	neoLab
Waagen	a) CP64 b) 1212 MP	Sartorius AG Sartorius AG
Zentrifugen	a) Beckman Avanti J-25 b) Eppendorf Zentrifuge 5810 R c) Ultrazentrifuge Beckman Optima L-60	Beckman Coulter Eppendorf Beckman Coulter
	Rotoren: JA-10, JA-25.50, 50Ti	Beckman Coulter

2.1.3 Spezielle Materialien

Tab. 2.3: verwendete Materialien

Material	Beschreibung	Artikel- nummer	Hersteller
AEX Säulchen	HiTrap Q (1 ml)	17-1153-01	GE Healthcare/ Amersham
Cellophan Folie	Zur Konservierung von Proteingelen	K422.1	Roth
Chromatographie Papier	17 CHR	3017915	Whatman
Cryo-Gefäße	Zur Lagerung von Glyzerinkryokulturen	E309.1	Roth
Deckgläschen	12 mm Deckgläschen	P.231.2	Roth
Dünnschichtplatten	Kieselgel 60 WF254s	1.16484	Merck
Elektroporationsküvetten	Küvetten für den CellPorator	11608-031	Whatman
Filter	a) Rotilabo®Spritzenfilter 13mm b) FP30/0.3 CA-S-Sterilfilter	T056.1 10462200	Roth Schleicher & Schuell
Gelfiltrationssäule	Superdex 200 10/300 GI	17-5175-01	GE Healthcare/ Amersham
Glasröhrchen	Gefäß zur Bakterienkultivierung	231721197	Schott

Glutathion Sepharose Säulchen	GSTrap HP (1 ml)	17-5281-01	GE Healthcare/Amersham
Kanüle	24-gauge Sterican Gr. 17	4657675	B. Braun
Küvetten	Einmal-Küvetten aus PMMA	P.95.1	Roth
Amylose Sepharose Säulchen	MBPTrap HP (1 ml)	28-9187-78	GE Healthcare/Amersham
Dialysekammer	Slide-A-Lyzer Dialysis Cassettes	66380	Thermo scientific
Mikrotiterplatten	96-well, F-Form	3911925	Anicrin
Objektträger	a) Poly-L-Lysin Objektträger	L198.1	Roth
	b) Objektträger, geschliffen	ECN 631-1552	VWR
Polypropylen Säulchen	Poly-Prep Chromatography Columns	731-1550	BioRad
PVDF-Membran	Immobilon-P	IPVH00010	Millipore
Reaktionsgefäße	a) 1,5 ml/ 2 ml Safe-Lock Tubes	0030.120.086/ 0030.120.094	Eppendorf
	b) PCR Tubes	683201	Greiner bio-one
	c) 15 ml/ 50 ml Tubes	188271/227270	Greiner bio-one
Serologische Pipetten	10 ml/ 25 ml, steril, BD Falcon	357530/356535	BD Bioscience
Spitzen	Einmal-Spitzen für Plattiergerät Eddy Jet	1780 (× 4)	IUL Instruments
Spritze	Omnifix®-F ohne Kanüle	9161406V	B. Braun
Strep-Tactin Sepharose	Strep-Tactin® Superflow® high capacity 50% suspension	2-1208-025	IBA
Whatman Papier	Gel Blotting Papier	10426994	Whatman GmbH

2.1.4 Chemikalien

Tab. 2.4: verwendete Chemikalien

Chemikalienbezeichnung	Artikelnummer	Hersteller
Acrylamid-Bisacrylamid Rotiphorese® Gel 30	3029.2	Roth
Agar	101618	Merck
Agarose	V3125	Promega
Ammoniumacetat	A1542	Sigma-Aldrich
Ammoniumpersulfat (APS)	0486	Amresco
Ampicillin Natriumsalz	A9518	Sigma-Aldrich
L-Arabinose	A3256	Sigma-Aldrich
Bromphenolblau/Xylencyanol	B3269	Sigma-Aldrich
BSA (Rinderserum Albumin)	K41-001	PAA
BugBuster® Master Mix	71456-4	Novagen
Chloramphenicol	C-1919/C-0378	Sigma-Aldrich
Chloroform	102445	Merck
Coomassie, kolloidal (Roti®-Blue)	A152.1	Roth
1,4-Dithiothreitol (DTT)	6908.1	Roth
Diethylether	100921	Merck
D-Desthiobiotin	2-1000-002	IBA
6x DNA Loading Dye	R0611	Fermentas
dNTP, Nukleotid Mix 10mM	BIO-39043	Bioline
DyLight 488 NHS Ester Amino-Reactive Dye	46402	Thermo Scientific
Ethanol, zur Analyse	100983	Merck
Ethidiumbromid	111608	Merck
D-(+)-Glukose	G7021	Sigma-Aldrich
γ-L-Glutamyl-L-cysteinyl-glycin (GSH)	6382.1	Roth
Glyzerin 86%	7533.3	Roth
Glycin	3908.2	Roth
Harnstoff	2317.1	Roth
Hefeextrakt	212720	BD Bioscience
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure (HEPES)	9105.3	Roth
Imidazol	1.04716.0250	Merck
Isopropyl-β-D-thiogalaktosid (IPTG)	BIO-37036	Bioline

Kaliumchlorid	104936	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	104873	Merck
Di-Kaliumhydrogenphosphat	105104	Merck
Kaliumhydroxid Plätzchen	105033	Merck
Kanamycinmonosulfat	K-1377	Sigma-Aldrich
<i>Legionella</i> α Agarplatten (BCYE)	1860e	Heipha
<i>Legionella</i> Basis-Agar	110242	Merck
<i>Legionella</i> Wachstums-Supplement	SR 0110C	Oxoid
Magnesiumchlorid Hexahydrat	105833	Merck
Magnesiumsulfat Heptahydrat	105886	Merck
Maltose	8951.1	Roth
β-Mercaptoethanol	M7522	Sigma-Aldrich
Methanol	T909.1	Roth
Naphtolblauschwarz	195243	Sigma-Aldrich
Natriumazid	106688	Merck
Natriumchlorid	3957.2	Roth
Natrium EDTA (Triplex III)	108418	Merck
Di-Natriumhydrogenphosphat	106575	Merck
NP-40	74385	Flucka
dNTP, Nukleotid Mix 40 mM	BIO-39043	Bioline
Paraformaldehyd	8.187515.0100	Merck
Pepton	LP0085	Oxoid
Ponceau S-Lösung	P7170	Sigma
2-Propanol, Isopropanol	6752.4	Roth
Proteaseinhibitormix complete, EDTA-free	11873580001	Roche
Roti-Nanoquant	K880.1	Roth
Rotipuran Wasser	T172.2	Roth
Salzsäure, rauchend	100317	Merck
Skim Milk Powder	70166	Fluka
Sodium-Dodecylsulfat (SDS)	CN30.2	Roth
Strep-tag® regeneration buffer with HABA 10× BufferR	2-1002-100	IBA
Tetracyclinhydrochlorid	T7660	Sigma-Aldrich
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	2367.3	Roth
Trichloressigsäure	8789.1	Roth
Tris Base	T8, 760-2	Sigma-Aldrich
Triton X-100	T8787	Sigma-Aldrich
Trypton	L47	Oxoid
Tween20	817072	Merck

2.1.5 Puffer und Lösungen

Tab. 2.5: verwendete Lösungen und Puffer

Lösung/Puffer	Zusammensetzung	Konzentration/Menge
PBS Puffer (pH 7,2) zu 1000 ml H ₂ O _{bidest}	KCl KH ₂ PO ₄ Na ₂ HPO ₄ NaCl	0,2 g 0,2 g 1,15 g 8 g
Tris Puffer (pH 7,5) für Lipidanalyse	Tris Base	40 mM
TBS Puffer (pH 8,0)	Tris Base NaCl	10 mM 137 mM
Puffer für die DNA-Gelelektrophorese		
50x TAE Puffer (pH 8,0)	Tris Base Eisessig Na ₂ EDTA	2,0 M 1,0 M 0,1 M

DNA Probenpuffer	Bromphenolblau	0,25% (w/v)			
	Glyzerin	30% (v/v)			
Puffer für die Protein-Gelelektrophorese und Western Blot					
SDS-PAGE Probenpuffer	Tris Base (pH 6,8)	62,5 mM			
	SDS	2% (w/v)			
	Glyzerin	10% (v/v)			
	β-Mercaptoethanol	2% (v/v)			
	Bromphenolblau	0,1% (w/v)			
SDS-PAGE Laufpuffer	Tris Base	25 mM			
	Glycin	192 mM			
	SDS	0,1% (w/v)			
Dehydratisierungslösung für Proteingele	EtOH	20% (v/v)			
	Glyzerin	10% (v/v)			
Western Blot Transferpuffer	Tris Base	25 mM			
	Glycin	192 mM			
	Methanol	10% (v/v)			
Western Blot Waschpuffer (TBS-T)	1x TBS Puffer	500 ml			
	Tween 20	0,1% (v/v)			
Western Blot Blocklösung	TBS-T	50 ml			
	Milchpulver	5% (w/v)			
Puffer für die Proteinreinigung über GST-Tag					
Proteinbindepuffer (pH 7,2)	PBS Puffer (siehe oben)				
Waschpuffer	PBS Puffer				
	Tween 20	0,1% (v/v)			
Elutionspuffer (pH 8,0)	Tris-HCl	50 mM			
	Reduziertes Glutathion	20 mM			
Puffer für die Proteinreinigung über MBP-Tag					
CB Puffer (pH 7,4)	Tris Base	20 mM			
	NaCl	200 mM			
Elutionspuffer (pH 7,4)	Tris Base	20 mM			
	NaCl	200 mM			
	Maltose	20 mM			
Puffer für die Proteinreinigung über Strep-Tag					
Waschpuffer (pH 8,0)	Tris Base	100 mM			
	NaCl	100 mM			
	EDTA	1 mM			
Elutionspuffer (pH 8,0)	Tris Base	100 mM			
	NaCl	100 mM			
	EDTA	1 mM			
	D-Desthiobiotin	8 mM			
SDS-Trenngel					
	7,5%	10%	12,5%		
Acrylamid/ Bisacrylamid 30%	2,5 ml	3,3 ml	4,2 ml	Acrylamid/ Bisacrylamid 30%	530 µl
1,5 M Tris Base (pH 8,8)	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	0,5 M Tris Base (pH 6,8)	1 ml
H ₂ O	4,8 ml	4 ml	3,1 ml	H ₂ O	2,4 ml
10% SDS	100 µl	100 µl	100 µl	10% SDS	40 µl
10% APS	100 µl	100 µl	100 µl	10% APS	50 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl	TEMED	4 µl
				SDS-Sammelgel	
					4%
				Acrylamid/ Bisacrylamid 30%	530 µl
				0,5 M Tris Base (pH 6,8)	1 ml
				H ₂ O	2,4 ml
				10% SDS	40 µl
				10% APS	50 µl
				TEMED	4 µl

2.1.6 Kommerzielle Kits

Tab. 2.6: verwendete Kits

Kitbezeichnung	Artikelnummer	Hersteller
BigDye Terminator V 3.1 Ready Cycle Sequencing Kit	4337035	Applied Biosystems
Western Blot Detektionskit: SuperSignal® West Dura	34075	Thermo Scientific
Extended Duration Substrate		
Champion™ pET Directional TOPO® Expression Kit	K160-01	Invitrogen
Nefa HR Kit	434-91795	Wako Chemicals
QIAprep Spin Miniprep Kit	27106	QIAGEN
QIAquick PCR Purification Kit	28104	QIAGEN
QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit	200519	Stratagene
LIVE/DEAD® BacLight Kit	L7012	Invitrogen

2.1.7 Lipide

Tab. 2.7: verwendete Lipidsubstrate

Lipidbezeichnung	Abkürzung	Artikelnummer	Hersteller
1,2-Dipalmitoyl-sn-Glyzero-3-Phosphocholin	PC	850355P	Avanti Polar Lipids
1,2-Dipalmitoyl-sn-Glyzero-3-Phospho-rac-1-Glyzerol	PG	840455P	Avanti Polar Lipids
1-Palmitoyl-2-Hydroxy-sn-Glyzero-3-Phosphocholin	LPC	855675P	Avanti Polar Lipids
1-Palmitoyl-2-Hydroxy-sn-Glyzero-3-Phospho-Glyzerol	LPG	858122P	Avanti Polar Lipids

2.1.8 Standards, Enzyme und Antikörper

Tab. 2.8: verwendete Standards für Elektrophoresen

Standardbezeichnung	Bereich	Artikelnummer	Hersteller
Gene Ruler DNA Laddermix	0,1-10 kb	SM0331	Thermo Scientific
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	10-170 kDa	SM0671	Thermo Scientific
Page Ruler™ Unstained Protein Ladder	10-200 kDa	SM0661	Thermo Scientific
Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder	10-260 kDa	SM1841	Thermo Scientific
NativeMark™ Unstained Protein Standard	20-1048 kDa	LC0725	Invitrogen

Tab. 2.9: verwendete Enzyme

Enzym	Artikelnummer	Hersteller
Antarctic Phosphatase (AP)	M0289	NEB
Enterokinase, light chain	P8070S	NEB
Faktor Xa Protease	P8010S	NEB
Lysozym	L-7651	Sigma-Aldrich
PCR-Sequenzierungs-Polymerase (BigDye 3.1)	4337035	Applied Biosystems
Pfu DNA Polymerase	EP0501	Thermo Scientific
Pfu turbo DNA Polymerase	600252-52	Stratagene
Phusion® High Fidelity DNA Polymerase F530-L	F530L	Thermo Scientific
PreScission Protease	27-0843-01	GE Healthcare
Proteinase K	P-2308	Sigma-Aldrich
Restriktionsendonukleasen	-	NEB
T4 DNA Ligase	M0202	NEB
T4 Polynukleotidkinase	M0236 S	NEB
Taq DNA Polymerase	M0267	NEB

Tab. 2.10: verwendete Antikörper

Antikörper	Spender	Konjugat	Artikelnummer	Hersteller/Herkunft	Eingesetzte Verdünnung
primär:					
α -DnaK (monoklonal)	Maus	-	SR-880D	BIOZOL	1:1000
α -GST (monoklonal)	Maus	-	Sc-138	Santa Cruz	1:1000
α -His (monoklonal)	Maus	-	27-4710-01	GE Healthcare	1:3000
α -LepB (polyklonal)	Kaninchen	-	-	Prof. G. Heinje (Vranckx <i>et al.</i> , 2007, De Buck <i>et al.</i> , 2007, De Buck <i>et al.</i> , 2008)	1:3000
α -MBP (monoklonal)	Maus	-	E8032S	NEB	1:5000
α -MOMP1 aus LegiMonofluoKit	Maus	-	32514	BioRad	1:2000
α -PlaB (polyklonal)	Kaninchen	-	-	BioGenes (diese Arbeit)	1:500
StrepMAB-Classic (monoklonal)	Maus	HRP	2-1509-001	IBA	1:3000
sekundär:					
α -Kaninchen	Ziege	HRP	A0545	Sigma	1:10000
α -Maus	Ziege	HRP	A9044	Sigma	1:10000

2.1.9 Oligonukleotide und Plasmide

Tab. 2.11: verwendete Oligonukleotide

Primer-bezeichnung	Primer Nr.	Schmelz-temp. (T _m [°C])	Sequenz (5'→3')	Anwendung
plaB_Ecof2	416	62	CCGGAATTCAGGAGCGTTACCATGATTGTT	K
plaB_EagIr	362	62	GACGGCCGAATTGTGGCTAGATGAC	K
plaB-EcoRI	1455	47	AGGAATTCATGATTGTTATCT	K
plaB_SalI	1454	52	CTGGTCCGACTCAATCTATCTTT	K
plaB_Nt_TOPOf	1451	49	CACCATGATTGTTATCTTCG	K
plaB_Nt_TOPOr	1452	41	TCAAGTCTCTTTAGTAAT	K
plaB_Ct_TOPOf	1453	54	CACCATGCAGAAAAATGAGCATA	K
plab_b1-r	235	48	CCAGTAAGTACAAAGGAATAG	S
plaB_d1 f	237	57	GCATTGAACCGGGAAAGTGTG	S
pGEX_fw	605	66	GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG	S, Kol PCR
pGEX_rv	606	64	CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG	S, Kol PCR
T7Promo	289	48	TAATACGACTCACTATAGGG	S, Kol PCR
T7Terminat	290	53	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	S, Kol PCR
pMALc2Ef	1456	59	CAGACTGTTCGATGAAGCCC	S, Kol PCR
pMalc2Er	1457	61	CGGGCCTCTTCGCTATTACG	S, Kol PCR
plaB10aaTOPOr	1501	59	TCAGATTTTTGCCGGAGTAAGGTTGTT	K
plaB-5aaTOPOr	1500	55	TCAAGTTGGCTTTCCACTGATTT	K
plaB-15aaTOPOr	1519	57	TCAAAGGTTGTTGCTGATACGGAAAA	K

plaBT460Af	1618	62	GCAACAACCTTGCTCCGGCAAAAATCAG	M
plaBT460Ar	1619	62	CTGATTTTTGCCGGAGCAAGGTTGTTGC	M
plaBK463Af	1616	61	CTTACTCCGGCAGCAATCAGTGGAAG	M
plaBK463Ar	1615	61	CTTTCCACTGATTGCTGCCGGAGTAAG	M
plaBS465Af	1614	63	GGCAAAAATCGCTGGAAAGCCAACTGG	M
plaBS465Ar	1613	63	CCAGTTGGCTTTCCAGCGATTTTTGCC	M
plaBK467Af	1611	62	CAAAAATCAGTGGAGCACCAACTGGCA	M
plaBK467r	1612	62	TGCCAGTTGGTGTCTCCACTGATTTTTG	M
plaBT469Af	1922	63	AGTGGAAAGCCAGCCGGCAAAAAGATA	M
plaBT469Ar	1921	63	TATCTTTTTGCCGGCTGGCTTTCCACT	M
plaBK471Af	1619	61	AAGCCAACCTGGCGCAAAGATAGATTGA	M
plaBK471Ar	1620	61	TCAATCTATCTTTGCGCCAGTTGGCTT	M
plaBK472Af	1624	61	CCAACCTGGCAAAGCGATAGATTGATACCTC	M
plaBK472Ar	1623	61	GAGGTATCAACTTATCGCTTTGCCAGTTGG	M
plaBD474Af	1625	60	ACTGGCAAAAAGATAGCGTGATACCTCTTT	M
plaBD474Ar	1626	60	AAAGAGGTATCACGCTATCTTTTTGCCAGT	M
pMalc2eQC1f	1607	61	AACAACCTCGAGGTTCTCTTTGACAAGGTA	M
pMalc2eQC1r	1608	61	TACCTTGTCAAAAGAGAACCTCGAGGTTGTT	M
pMalc2eQC22f	1791	63	GTTCTCTTTCAAGGGCCACCGGAATTCATG	M
pMalc2eQC22r	1790	63	CATGAATTCCGGTGGCCCTTGAAAGAGAAC	M
plaB_SmaIr	1792	54	CTACCCGGGTCAATCTATCTTT	K
plaBkpnIf	1794	51	CAGGGTACCATGATTGTTATC	K
pGP172XmalIf	1789	62	CTACCCGGGGATCCGGCT	K
pGP172KpnIr	1788	61	GATGGTACCGGCGCCTTTTTTCG	K
pBCKSf	1797	64	AGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTA	M
pBCKSr	1796	64	TAATCGCCTTGACGACATCCCCCT	M
pBC_a1_f	212	52	GGTTTTCCAGTCACGA	S, Kol PCR
pBC_b1_r	213	54	CGCGCAATTAACCCCTCAC	S, Kol PCR
strepplaBD203Nf	1875	59	GAATCTGGATCCAATGGGGTGGTAC	M
strepplaBD203Nr	1876	59	GTACCACCCCATTTGGATCCAGATTC	M
strepplaBH251Nf	1877	58	CTACCTGGACTTTCAAATTCCGGTAAAAAT ATC	M
strepplaBH251Nr	1878	58	GATATTTTTTACCGGAATTTGAAAGTCCAGG TAG	M
strepplaBS85Af	1873	65	GTATCACTCACGCTACCGGTGGGCC	M
strepplaBS85Ar	1874	65	GGCCACCGGTAGCGTGAGTGATAC	M
pGP172plaB-5f	1906	68	GAAAGCCAACCTTGACCCGGGGATCCGGC	K
pGP172plaB-5r	1907	68	CCGGGTCAAGTTGGCTTTCCACTGATTTTT GCCGGAG	K
pGP172plaB-10f	1908	66	GCAAAAATCTGACCCGGGGATCCGGC	K
pGP172plaB-10r	1909	66	CCGGGTCAAGTTTTTGGCCGAGTAAGGTTG TTGC	K
pGP172plaB-15f	1910	67	CAACAACCTTTGACCCGGGGATCCGGC	K
pGP172plaB-15r	1911	66	CCGGGTCAAAGTTGTTGCTGATACGGAAA ACTGTCC	K
Strep_fw	1991	60	AGCCACCCGCAGTTCGAA	Kol PCR
Strep_rv	1992	60	TTCGAAGTGCGGGTGGCT	Kol PCR
CtStreppJB04f1	2109	68	CTTGAGGCCACCCGCAGTTCGAAAAATGAT ACCTCTTTTCGTTTGATGC	K
CtStreppJB04r1	2110	70	CGAACTGCGGGTGGCTCCAAGCGCTATCTA TCTTTTTGCCAGTTGGC	K
pJB04-15Ctf	2132	60	CAACAACCTTTGATACCTCTTTCGTTTGATGC	K

pJB04-15Ctr	2133	62	GAGGTATCAAAGGTTGTTGCTGATACGGAA AACTG	K
pJB04-20Ntf	2128	64	CAAGGAGCGTTATGCCTCAATGGCTTGAAA ATCAG	K
pJB04-20Ntr	2129	64	GCCATTGAGGCATAACGCTCCTTGAATCGT TG	K
pJB04-50Ntf	2130	64	CAAGGAGCGTTATGACGGTGACGGTTGACGA TATAG	K
pJB04-50Ntr	2131	64	CCGTCACCGTCATAACGCTCCTTGAATCGT TG	K
pJB04-50Ctfl	2136	53	TGATACCTCTTTCGTTTGATGC	K
pJB04-50Ctrfl	2137	51	CGATGAATGAAAAATCAAGTAACC	K
pJB04-100Ctf	2185	58	GCGAAATCTCAATAATCGATGAAAAGTACT TATTTTC	M
pJB04-100Ctr	2186	58	GAAAATAAGTCAGTTTTTCATCGATTATTGAG ATTTCGC	M
pJB04-150Ctf	2187	56	CGAGTATATAACCAATTGATACTCTATGAT TATTTTCC	M
pJB04-150Ctr	2188	56	GGAAAATAATCATAGAGTATCAATTGGTTA TATACTCG	M
pJB04-170Ctf	2250	54	CTAAAGAGACTTAGAAAAATGAGCATAAGG	M
pJB04-170Ctr	2249	54	CCTTATGCTCATTTTTCTAAGTCTCTTTAG	M
Ct303474strepf	2251	60	GAGCGTTATGCAGAAAAATGAGCATAA GGAATTTG	K
Ct303474strepr	2252	61	CATTTTTCTGCATAACGCTCCTTGAATCGTTG TC	K
plaBS456Af	2257	58	GTTTTCCGTATCGCCAACAACCTTAC	M
plaBS456Ar	2258	58	GTAAGGTTGTTGGCGATACGGAAAAAC	M
plaBN458Af	2261	60	GTATCAGCAACGCCCTTACTCCG	M
plaBN458Ar	2262	58	GGAGTAAGGGCGTTGCTGATAC	M

Abkürzungen: S = Sequenzierung, K = Klonierung, Kol PCR = Kolonie-Polymerasekettenreaktion, M = Mutagenese

Tab. 2.12: verwendete Plasmide

Erworbene Plasmidbezeichnung		Plasmide Artikelnummer	Hersteller/ Herkunft	
pGEX-6P-1		27-4597-01	GE Healthcare	
pMALc2X		N8076	NEB	
pMAL-c2E		N8066	NEB	
pET160/GW/D-TOPO		K160-01	Invitrogen	
pGP172		-	S. Halbedel (Merzbacher <i>et al.</i> , 2004)	
pJB03 (pET160/GW/D-TOPO + <i>plaB</i>)		-	(J. Bender, unveröffentlicht)	
pJB04 (pBCKS + <i>plaB</i>)		-	(Bender <i>et al.</i> , 2009)	
pG-KJE8		-	G. Wilharm (Nishihara <i>et al.</i> , 2000)	
Plasmid- bezeichnung	Erzeugte Konstrukt	Insertgröße (bp)	AB- resistenz	Amplifizierungsprimer
pKK1	pGEX-6P-1 + <i>plaB</i>	1494	Amp	plaB_Ecof2/plaB_EagIr
pKK2	pET160/GW/D-TOPO + <i>plaB</i> _{AS303-474}	576	Amp	plaB_Ct_TOPOf/plaB_EagIr
pKK3	pET160/GW/D-TOPO + <i>plaB</i> _{AS1-302}	909	Amp	plaB_Nt_TOPOf/plaB_NT_TOPOr
pKK4	pMal-c2E + <i>plaB</i>	1425	Amp	plaB_EcoRIIf/plaB_SalIr

pKK5	pET160/GW/D-TOPO + <i>plaB</i> _{AS1-464}	1395	Amp	plaB_Nt_TOPOf/plaB10aaTOPOr
pKK6	pET160/GW/D-TOPO + <i>plaB</i> _{AS1-469}	1410	Amp	plaB_Nt_TOPOf/plaB-5aaTOPOr
pKK7	pMal-c2X + <i>plaB</i>	1425	Amp	plaB_EcoR1f/plaB_SalIr
pKK8	pET160/GW/D-TOPO + <i>plaB</i> _{AS1-459}	1380	Amp	plaB_Nt_TOPOf/plaB-15aaTOPOr
pKK9	pET160/GW/D-TOPO + <i>plaB</i> _{T460A}	1664	Amp	plaBT460Af/plaBT460Ar
pKK10	pET160/GW/D-TOPO + <i>plaB</i> _{K463A}	1664	Amp	plaBK463Af/plaBK463Ar
pKK11	pET160/GW/D-TOPO + <i>plaB</i> _{S465A}	1664	Amp	plaBK463Af/plaBK463Ar
pKK12	pET160/GW/D-TOPO + <i>plaB</i> _{K467A}	1664	Amp	plaBK467Af/plaBK467Ar
pKK13	pET160/GW/D-TOPO + <i>plaB</i> _{T469A}	1664	Amp	plaBT469Af/plaBT469Ar
pKK14	pET160/GW/D-TOPO + <i>plaB</i> _{K471A}	1664	Amp	plaBK471Af/plaBK471Ar
pKK15	pET160/GW/D-TOPO + <i>plaB</i> _{K472A}	1664	Amp	plaBK472Af/plaBK472Ar
pKK16	pET160/GW/D-TOPO + <i>plaB</i> _{K474A}	1664	Amp	plaBD474Af/plaBD474Ar
pKK17	pMal-c2E + <i>plaB</i>	1425	Amp	pMalc2EQC1f/pMalc2EQC1r
pKK18	pMal-c2E + <i>plaB</i>	1425	Amp	pMalc2eQC22f/pMalc2eQC22r
pKK19	pGP172 + <i>plaB</i>	1425	Amp	plaBSmaIr/plaB_kpnIf
pKK21	pGP172 + <i>plaB</i> _{D203N}	1425	Amp	strepplaBD203Nf/strepplaBD203Nr
pKK22	pGP172 + <i>plaB</i> _{H251N}	1425	Amp	strepplaBH251Nf/strepplaBH251Nr
pKK23	pGP172 + <i>plaB</i> _{S85A}	1425	Amp	strepplaBS85Af/strepplaBS85Ar
pKK25	pGP172 + <i>plaB</i> _{AS1-169}	1410	Amp	pGP172plaB-5f/pGP172plaB-5r
pKK26	pGP172 + <i>plaB</i> _{AS1-164}	1395	Amp	pGP172plaB-10f/pGP172plaB-10r
pKK27	pGP172 + <i>plaB</i> _{AS1-159}	1380	Amp	pGP172plaB-15f/pGP172plaB-15r
pKK43	pJB04 + C-terminaler Strep- Tag	1630	Cm	CtstreppJB04f1/CtstreppJB04r1
pKK48	pJB04 + <i>plaB</i> _{AS21-474}	1528	Cm	pJB04-20Ntf/pJB04-20Ntr
pKK49	pJB04 + <i>plaB</i> _{AS51-474}	1438	Cm	pJB04-50Ntf/pJB04-50Ntr
pKK50	pJB04 + <i>plaB</i> _{AS1-459}	1540	Cm	pJB04-15Ctf/pJB04-15Ctr
pKK51	pJB04 + <i>plaB</i> _{AS1-424}	1435	Cm	pJB04-50Ctfbl/pJB04-50Ctrbl
pKK54	pJB04 + <i>plaB</i> _{G374STOP}	1585	Cm	pJB04-100Ctf/pJB04-100Ctr
pKK55	pJB04 + <i>plaB</i> _{R324STOP}	1585	Cm	pJB04-150Ctf/pJB04-150Ctr
pKK56	pET160/GW/D-TOPO + <i>plaB</i> _{S456A}	1664	Amp	plaBS456Af/plaBS456Ar
pKK57	pET160/GW/D-TOPO + <i>plaB</i> _{N458A}	1664	Amp	plaBN458Af/plaBN458Ar
pKK58	pJB04 + <i>plaB</i> _{Q303STOP}	1585	Cm	pJB04-170Ctf/pJB04-170Ctr
pKK59	pJB04 + <i>plaB</i> _{AS51-474 + R324STOP}	1438	Cm	pJB04-50Ntf/pJB04-50Ntr/ pJB04-170Ctf/pJB04-170Ctr
pKK60	pJB04 + <i>plaB</i> _{AS303-474 + C-terminaler Strep-Tag}	724	Cm	Ct303474strepf/Ct303474strepr

2.1.10 Bakterienstämme

Tab. 2.13: verwendete Bakterienstämme

Stamm	Katalog-Nr.	Referenz
<i>Escherichia coli</i> DH5α	18258-012	Invitrogen
<i>Escherichia coli</i> TOP10	C664-55	Invitrogen
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	C161003	Invitrogen
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)pLysS	C6060-10	Invitrogen
<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue	200249	Stratagene
<i>Legionella pneumophila</i> Sg1 Corby (<i>Lpn</i> Corby)	-	(Jepras <i>et al.</i> , 1985)
<i>Legionella pneumophila</i> Sg1 Corby <i>plaB1</i> (<i>plaB::km</i> Insertionsmutante)	-	(Flieger <i>et al.</i> , 2004)
<i>Legionella pneumophila</i> Sg1 Corby <i>plaB1</i> (pJB04) Komplementante	-	(Bender <i>et al.</i> , 2009)
<i>Legionella pneumophila</i> Sg1 JR32 (<i>Lpn</i> JR32)	-	(Sadosky <i>et al.</i> , 1993)
<i>L.pn.</i> JR32 <i>dotA</i> Mutante	-	(Segal <i>et al.</i> , 1998, Sadosky <i>et al.</i> , 1993)
<i>L.pn.</i> JR32 <i>dotB</i> Mutante	-	(Segal <i>et al.</i> , 1999)
<i>L.pn.</i> JR32 <i>lvh</i> Mutante	-	(Segal <i>et al.</i> , 1999)
<i>L.pn.</i> JR32 <i>dotB/lvh</i> Mutante	-	(Segal <i>et al.</i> , 1999)
<i>L.pn.</i> Corby <i>lssB</i> Mutante	-	(Jacobi & Heuner, 2003)
<i>L.pn.</i> Corby <i>lspDE</i> Mutante	-	(Schunder <i>et al.</i> , 2010)
<i>L.pn.</i> Corby <i>tatC</i> Mutante	-	(De Buck <i>et al.</i> , 2005)

Tab. 2.14 verwendete und erzeugte gentechnisch veränderte Organismen

GVO-Bezeichnung	Klon-Nr.	Konstrukt	Anmerkung
<i>E. coli</i>			
DH5α (pKK1)	9	pGEX-6P-1 + <i>plaB</i>	Klonierung zur Überexpression von PlaB mit N-terminalem GST-Tag
BL21 (DE3)	2	pGEX-6P-1 + <i>plaB</i>	Überexpression von PlaB mit N-terminalem GST-Tag
(pKK1)			
TOP10 (pKK2)	1	pET160/GW/D-TOPO + <i>plaB</i> _{AS303-474}	Klonierung C-terminaler Region von PlaB (AS 303-474) mit N-terminalem 6x His-Tag
BL21 (DE3)	3	pET160/GW/D-TOPO + <i>plaB</i> _{AS303-474}	Überexpression C-terminaler Region von PlaB (AS 303-474) mit N-terminalem 6x His-Tag
(pKK2)			
TOP10 (pKK3)	12	pET160/GW/D-TOPO + <i>plaB</i> _{AS1-302}	Klonierung N-terminaler Region von PlaB (AS 1-302) mit N-terminalem 6x His-Tag
BL21 (DE3)	5	pET160/GW/D-TOPO + <i>plaB</i> _{AS1-302}	Überexpression N-terminaler Region von PlaB (AS 1-302) mit N-terminalem 6x His-Tag
(pKK3)			
DH5α (pKK4)	5	pMal-c2E + <i>plaB</i>	Klonierung zur Überexpression von PlaB mit N-terminalem MBP-Tag mit Enterokinase-Schnittstelle
BL21 (DE3)pLysS	1	pMal-c2E + <i>plaB</i>	Überexpression von PlaB mit N-terminalem MBP-Tag
(pKK4)			
TOP10 (pKK5)	4	pET160/GW/D-TOPO + <i>plaB</i> _{AS1-464}	Klonierung C-terminaler Verkürzung von PlaB (AS 1-464) mit N-terminalem 6x His-Tag
BL21 (DE3)	1	pET160/GW/D-TOPO + <i>plaB</i> _{AS1-464}	Überexpression C-terminaler Verkürzung von PlaB (AS 1-464) mit N-terminalem 6x His-Tag
(pKK5)			

TOP10 (pKK6)	4	pET160/GW/D-TOPO + <i>plaB</i> _{AS1-469}	Klonierung C-terminaler Verkürzung von PlaB (AS 1-469) mit N-terminalem 6x His-Tag
BL21 (DE3) (pKK6)	1	pET160/GW/D-TOPO + <i>plaB</i> _{AS1-469}	Überexpression C-terminaler Verkürzung von PlaB (AS 1-469) mit N-terminalem 6x His-Tag
TOP10 (pKK7)	7	pMal-c2X + <i>plaB</i>	Klonierung zur Überexpression von PlaB mit N-terminalem MBP-Tag mit FaktorXa-Schnittstelle
BL21 (DE3)pLysS (pKK7)	1	pMal-c2X + <i>plaB</i>	Überexpression von PlaB mit N-terminalem MBP-Tag mit FaktorXa-Schnittstelle
TOP10 (pKK8)	4	pET160/GW/D-TOPO + <i>plaB</i> _{AS1-459}	Klonierung C-terminaler Verkürzung von PlaB (AS 1-459) mit N-terminalem 6x His-Tag
BL21 (DE3) (pKK8)	1	pET160/GW/D-TOPO + <i>plaB</i> _{AS1-459}	Überexpression C-terminaler Verkürzung von PlaB (AS 1-459) mit N-terminalem 6x His-Tag
XL1-Blue (pKK9)	1	pET160/GW/D-TOPO + <i>plaB</i> _{T460A}	Klonierung <i>site-directed</i> Mutante T460A von PlaB mit N-terminalem 6x His-Tag
XL1-Blue (pKK10)	2	pET160/GW/D-TOPO + <i>plaB</i> _{K463A}	Klonierung <i>site-directed</i> Mutante K463A von PlaB mit N-terminalem 6x His-Tag
XL1-Blue (pKK11)	1	pET160/GW/D-TOPO + <i>plaB</i> _{S465A}	Klonierung <i>site-directed</i> Mutante S465A von PlaB mit N-terminalem 6x His-Tag
XL1-Blue (pKK12)	1	pET160/GW/D-TOPO + <i>plaB</i> _{K467A}	Klonierung <i>site-directed</i> Mutante K467A von PlaB mit N-terminalem 6x His-Tag
XL1-Blue (pKK13)	1	pET160/GW/D-TOPO + <i>plaB</i> _{T469A}	Klonierung <i>site-directed</i> Mutante T469A von PlaB mit N-terminalem 6x His-Tag
XL1-Blue (pKK14)	1	pET160/GW/D-TOPO + <i>plaB</i> _{K471A}	Klonierung <i>site-directed</i> Mutante K471A von PlaB mit N-terminalem 6x His-Tag
XL1-Blue (pKK15)	2	pET160/GW/D-TOPO + <i>plaB</i> _{K472A}	Klonierung <i>site-directed</i> Mutante K472A von PlaB mit N-terminalem 6x His-Tag
XL1-Blue (pKK16)	1	pET160/GW/D-TOPO + <i>plaB</i> _{K474A}	Klonierung <i>site-directed</i> Mutante K474A von PlaB mit N-terminalem 6x His-Tag
BL21 (DE3) (pKK9)	1	pET160/GW/D-TOPO + <i>plaB</i> _{T460A}	Überexpression <i>site-directed</i> Mutante T460A von PlaB mit N-terminalem 6x His-Tag
BL21 (DE3) (pKK10)	1	pET160/GW/D-TOPO + <i>plaB</i> _{K463A}	Überexpression <i>site-directed</i> Mutante K463A von PlaB mit N-terminalem 6x His-Tag
BL21 (DE3) (pKK11)	1	pET160/GW/D-TOPO + <i>plaB</i> _{S465A}	Überexpression <i>site-directed</i> Mutante S465A von PlaB mit N-terminalem 6x His-Tag
BL21 (DE3) (pKK12)	1	pET160/GW/D-TOPO + <i>plaB</i> _{K467A}	Überexpression <i>site-directed</i> Mutante K467A von PlaB mit N-terminalem 6x His-Tag
BL21 (DE3) (pKK13)	1	pET160/GW/D-TOPO + <i>plaB</i> _{T469A}	Überexpression <i>site-directed</i> Mutante T469A von PlaB mit N-terminalem 6x His-Tag
BL21 (DE3) (pKK14)	1	pET160/GW/D-TOPO + <i>plaB</i> _{K471A}	Überexpression <i>site-directed</i> Mutante K471A von PlaB mit N-terminalem 6x His-Tag
BL21 (DE3) (pKK15)	1	pET160/GW/D-TOPO + <i>plaB</i> _{K472A}	Überexpression <i>site-directed</i> Mutante K472A von PlaB mit N-terminalem 6x His-Tag
BL21 (DE3) (pKK16)	1	pET160/GW/D-TOPO + <i>plaB</i> _{K474A}	Überexpression <i>site-directed</i> Mutante K474A von PlaB mit N-terminalem 6x His-Tag
XL1-Blue (pKK17)	1	pMal-c2E + <i>plaB</i>	erster Mutationsschritt in Enterokinase-Schnittstelle zur Prescission Protease-Schnittstelle

XL1-Blue (pKK18)	2	pMal-c2E + <i>plaB</i>	vollständig mutierte Enterokinase-Schnittstelle zu Prescissionprotease-Schnittstelle
BL21 (DE3)pLysS (pKK18)	1	pMal-c2E + <i>plaB</i>	Überexpression PlaB mit N-terminalem MBP-Tag und Prescissionprotease-Schnittstelle
TOP10 (pKK19)	3	pGP172 + <i>plaB</i>	Klonierung zur Überexpression von PlaB mit N-terminalem Strep-Tag
XL1-Blue (pKK21)	1	pGP172 + <i>plaB</i> _{D203N}	Klonierung <i>site-directed</i> Mutante D203N von PlaB mit N-terminalem Strep-Tag
BL21 (DE3)pLysS (pKK21)	1	pGP172 + <i>plaB</i> _{D203N}	Überexpression <i>site-directed</i> Mutante D203N von PlaB mit N-terminalem Strep-Tag
XL1-Blue (pKK22)	2	pGP172 + <i>plaB</i> _{H251N}	Klonierung <i>site-directed</i> Mutante H251N von PlaB mit N-terminalem Strep-Tag
BL21 (DE3)pLysS (pKK22)	1	pGP172 + <i>plaB</i> _{H251N}	Überexpression <i>site-directed</i> Mutante H251N von PlaB mit N-terminalem Strep-Tag
XL1-Blue (pKK23)	2	pGP172 + <i>plaB</i> _{S81A}	Klonierung <i>site-directed</i> Mutante S81A von PlaB mit N-terminalem Strep-Tag
BL21 (DE3)pLysS (pKK23)	1	pGP172 + <i>plaB</i> _{S81A}	Überexpression <i>site-directed</i> Mutante S81A von PlaB mit N-terminalem Strep-Tag
XL1-Blue (pKK25)	2	pGP172 + <i>plaB</i> _{AS1-469}	Klonierung C-terminaler Verkürzung von PlaB (AS 1-469) mit N-terminalem Strep-Tag
BL21 (DE3) (pKK25)	1	pGP172 + <i>plaB</i> _{AS1-469}	Überexpression C-terminaler Verkürzung von PlaB (AS 1-469) mit N-terminalem Strep-Tag
XL1-Blue (pKK26)	6	pGP172 + <i>plaB</i> _{AS1-464}	Klonierung C-terminaler Verkürzung von PlaB (AS 1-464) mit N-terminalem Strep-Tag
BL21 (DE3) (pKK26)	1	pGP172 + <i>plaB</i> _{AS1-464}	Überexpression C-terminaler Verkürzung von PlaB (AS 1-464) mit N-terminalem Strep-Tag
XL1-Blue (pKK27)	2	pGP172 + <i>plaB</i> _{AS1-459}	Klonierung C-terminaler Verkürzung von PlaB (AS 1-459) mit N-terminalem Strep-Tag
BL21 (DE3) (pKK27)	1	pGP172 + <i>plaB</i> _{AS1-459}	Überexpression C-terminaler Verkürzung von PlaB (AS 1-459) mit N-terminalem Strep-Tag
TOP10 (pKK43)	1	pJB04 + Strep-Tag	Klonierung PlaB mit C-terminalem Strep-Tag und endogenem Promotor
DH5α (pKK48)	4	pJB04 + <i>plaB</i> _{AS21-474}	Klonierung N-terminaler Verkürzung von PlaB (AS 21-464) mit endogenem Promotor
DH5α (pKK49)	4	pJB04 + <i>plaB</i> _{AS51-474}	Klonierung N-terminaler Verkürzung von PlaB (AS 51-464) mit endogenem Promotor
DH5α (pKK50)	1	pJB04 + <i>plaB</i> _{AS1-459}	Klonierung C-terminaler Verkürzung von PlaB (AS 1-459) mit endogenem Promotor
DH5α (pKK51)	11	pJB04 + <i>plaB</i> _{AS1-424}	Klonierung C-terminaler Verkürzung von PlaB (AS 1-424) mit endogenem Promotor
DH5α (pKK54)	1	pJB04 + <i>plaB</i> _{G374STOP}	Klonierung C-terminaler Verkürzung von PlaB (AS 1-373) mit endogenem Promotor
DH5α (pKK55)	1	pJB04 + <i>plaB</i> _{R324STOP}	Klonierung C-terminaler Verkürzung von PlaB (AS 1-323) mit endogenem Promotor

DH5α (pKK56)	1	pET160/GW/D-TOPO + <i>plaB</i> _{S456A}	Klonierung <i>site-directed</i> Mutante S456A von PlaB mit N-terminalem 6x His-Tag
DH5α (pKK57)	2	pET160/GW/D-TOPO + <i>plaB</i> _{N458A}	Klonierung <i>site-directed</i> Mutante N458A von PlaB mit N-terminalem 6x His-Tag
BL21 (DE3) (pKK56)	1	pET160/GW/D-TOPO + <i>plaB</i> _{S456A}	Überexpression <i>site-directed</i> Mutante S456A von PlaB mit N-terminalem 6x His-Tag
BL21 (DE3) (pKK57)	1	pET160/GW/D-TOPO + <i>plaB</i> _{N458A}	Überexpression <i>site-directed</i> Mutante N458A von PlaB mit N-terminalem 6x His-Tag
DH5α (pKK58)	2	pJB04 + <i>plaB</i> _{Q303STOP}	Klonierung C-terminaler Verkürzung von PlaB (AS 1-302) mit endogenem Promotor
DH5α (pKK59)	2	pJB04 + <i>plaB</i> _{AS51-474+Q303STOP}	Klonierung N- und C-terminaler Verkürzung von PlaB (AS 51-302) mit endogenem Promotor
DH5α (pKK60)	2	pJB04 + <i>plaB</i> _{AS303-474}	Klonierung N-terminaler Verkürzung von PlaB (AS 303-474) mit C-terminalem Strep-Tag und endogenem Promotor
<i>L. pneumophila</i>			
Corby			
<i>plaB1</i> (pKK43)	3	pJB04 + Strep-Tag	PlaB mit C-terminalem Strep-Tag und endogenem Promotor
<i>plaB1</i> (pKK48)	1	pJB04 + <i>plaB</i> _{AS21-474}	N-terminale Verkürzung von PlaB (AS 21-464) und endogenem Promotor für Lokalisationsstudien
<i>plaB1</i> (pKK49)	1	pJB04 + <i>plaB</i> _{AS51-474}	N-terminale Verkürzung von PlaB (AS 51-464) und endogenem Promotor für Lokalisationsstudien
<i>plaB1</i> (pKK50)	1	pJB04 + <i>plaB</i> _{AS1-459}	C-terminale Verkürzung von PlaB (AS 1-459) und endogenem Promotor für Lokalisationsstudien
<i>plaB1</i> (pKK51)	4	pJB04 + <i>plaB</i> _{AS1-424}	C-terminale Verkürzung von PlaB (AS 1-424) und endogenem Promotor für Lokalisationsstudien
<i>plaB1</i> (pKK54)	1	pJB04 + <i>plaB</i> _{G374STOP}	C-terminale Verkürzung von PlaB (AS 1-373) und endogenem Promotor für Lokalisationsstudien
<i>plaB1</i> (pKK55)	1	pJB04 + <i>plaB</i> _{R324STOP}	C-terminale Verkürzung von PlaB (AS 1-323) und endogenem Promotor für Lokalisationsstudien
<i>plaB1</i> (pKK58)	2	pJB04 + <i>plaB</i> _{Q303STOP}	C-terminale Verkürzung von PlaB (AS 1-302) und endogenem Promotor für Lokalisationsstudien
<i>plaB1</i> (pKK59)	2	pJB04 + <i>plaB</i> _{AS51-474Q303STOP}	N- und C-terminale Verkürzung von PlaB (AS 51-302) und endogenem Promotor für Lokalisationsstudien
<i>plaB1</i> (pKK60)	1	pJB04 + <i>plaB</i> _{AS303-474}	N-terminale Verkürzung von PlaB (AS 51-302) mit C-terminalem Strep-Tag und endogenem Promotor für Lokalisationsstudien

Tab. 2.15: Auflistung der aus der *error-prone* PCR-Klonbank isolierten DH5 α -Mutanten

GVO-Bezeichnung	Name der Mutante (= Klon-Nr.)	Plasmid-Charakter
DH5 α (pJB04 mit <i>plaBN212D</i>)	4	pJB04 mit <i>plaBN212D</i>
DH5 α (pJB04 mit <i>plaBL332F</i>)	7	pJB04 mit <i>plaBL332F</i>
DH5 α (pJB04 mit <i>plaBM439V</i>)	19	pJB04 mit <i>plaBM439V</i>
DH5 α (pJB04 mit <i>plaBV37A</i>)	36	pJB04 mit <i>plaBV37A</i>
DH5 α (pJB04 mit <i>plaBD203N</i>)	61	pJB04 mit <i>plaBD203N</i>
DH5 α (pJB04 mit <i>plaBE152K</i>)	63	pJB04 mit <i>plaBE152K</i>
DH5 α (pJB04 mit <i>plaBM113V</i>)	77	pJB04 mit <i>plaBM113V</i>
DH5 α (pJB04 mit <i>plaBP107L</i>)	89	pJB04 mit <i>plaBP107L</i>
DH5 α (pJB04 mit <i>plaBA404T</i>)	103	pJB04 mit <i>plaBA404T</i>
DH5 α (pJB04 mit <i>plaBE306K</i>)	91	pJB04 mit <i>plaBE306K</i>
DH5 α (pJB04 mit <i>plaBS47C</i>)	94	pJB04 mit <i>plaBS47C</i>
DH5 α (pJB04 mit <i>plaBL280Q</i>)	96	pJB04 mit <i>plaBL280Q</i>
DH5 α (pJB04 mit <i>plaBD342G</i>)	116	pJB04 mit <i>plaBD342G</i>
DH5 α (pJB04 mit <i>plaBD381G</i>)	117	pJB04 mit <i>plaBD381G</i>
DH5 α (pJB04 mit <i>plaBV6D</i>)	123	pJB04 mit <i>plaBV6D</i>
DH5 α (pJB04 mit <i>plaBM113I</i>)	128	pJB04 mit <i>plaBM113I</i>
DH5 α (pJB04 mit <i>plaBM113I</i>)	131	pJB04 mit <i>plaBM113I</i>
DH5 α (pJB04 mit <i>plaBD50G</i>)	135	pJB04 mit <i>plaBD50G</i>
DH5 α (pJB04 mit <i>plaBM113V</i>)	143	pJB04 mit <i>plaBM113V</i>
DH5 α (pJB04 mit <i>plaBD365G</i>)	145	pJB04 mit <i>plaBD365G</i>
DH5 α (pJB04 mit <i>plaBD334G</i>)	146	pJB04 mit <i>plaBD334G</i>
DH5 α (pJB04 mit <i>plaBN194D</i>)	153	pJB04 mit <i>plaBN194D</i>
DH5 α (pJB04 mit <i>plaBG144R</i>)	156	pJB04 mit <i>plaBG144R</i>
DH5 α (pJB04 mit <i>plaBW9R</i>)	157	pJB04 mit <i>plaBW9R</i>
DH5 α (pJB04 mit <i>plaBS326P</i>)	160	pJB04 mit <i>plaBS326P</i>
DH5 α (pJB04 mit <i>plaBC81R</i>)	165	pJB04 mit <i>plaBC81R</i>
DH5 α (pJB04 mit <i>plaBN194D</i>)	167	pJB04 mit <i>plaBN194D</i>
DH5 α (pJB04 mit <i>plaBL218S</i>)	183	pJB04 mit <i>plaBL218S</i>
DH5 α (pJB04 mit <i>plaBW9R</i>)	218	pJB04 mit <i>plaBW9R</i>

2.1.11 Nährmedien für Bakterien

Tab. 2.16: verwendete Nährmedien zur Anzucht von *E. coli*

Luria-Bertani (LB)-Flüssigmedium		Luria-Bertani (LB)-Agar	
Trypton	10 g	Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g	Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g	NaCl	5 g
H ₂ O _{bidest}	zu 1000 ml	Agar	15 g
		H ₂ O _{bidest}	zu 1000 ml
SOC-Medium (pH 7,2) (SOC = Super Optimal Broth-Derivat)		Humanblut-Agar	
Trypton	2 g		
Hefeextrakt	0,5 g		
NaCl	0,06 g	Humanblut	30 ml
KCl	0,019 g	LB-Agar	zu 1000 ml
Glukose	0,4 g		
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,24 g		
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	0,2 g		
H ₂ O _{bidest}	zu 1000 ml		
		Humanblut wurde mit 0,9%iger, steriler NaCl-Lösung gewaschen. Dem Agar wurden 1 mM IPTG und 30 µg/ml Chloramphenicol zugesetzt.	

Die Sterilisation der verwendeten Nährmedien erfolgte durch Autoklavieren bei 121 °C. Antibiotika und Glukose (steril filtriert) wurden nach dem Autoklavieren dem auf 55 °C abgekühlten Medium zugesetzt.

Tab. 2.17: verwendete Nährmedien zur Anzucht von *L. pneumophila*

BYE-Flüssigmedium (BYE = Buffered Yeast Extract)		BCYE-Agar (BCYE = Buffered Charcoal Yeast Extract)	
Hefeextrakt	10 g	<i>Legionella</i> Basis-Agar :	
<i>Legionella</i> Wachstums-Supplement	2 x 50 ml	Hefeextrakt	10 g
		Aktivkohle	1,5 g
H ₂ O _{bidest}	zu 1000 ml	Agar	16 g
		<i>Legionella</i> -Wachstums-Supplement	2 x 50 ml
		H ₂ O _{bidest}	zu 1000 ml
Das <i>Legionella</i> Wachstums-Supplement wurde zusammen mit dem Hefeextrakt in H ₂ O _{bidest} gelöst und anschließend steril filtriert.		Der <i>Legionella</i> Basis-Agar wurde in H ₂ O _{bidest} suspendiert und autoklaviert. Das Supplement wurde vorschriftsgemäß nach dem Autoklavieren steril bei 50 °C zugegeben.	

Der zur Anzucht von Legionellen verwendete BCYE-Agar wurde sowohl kommerziell erworben als auch selbst hergestellt. BCYE-Platten mit Antibiotikazusatz wurden generell selbst gegossen (Nährbodenküche, RKI Wernigerode).

Tab. 2.18: verwendete Antibiotika mit Endkonzentration im Medium

Antibiotikum	Stammlösung [mg/ml]	Endkonzentration für <i>L. pneumophila</i> [µg/ml]	<i>E. coli</i> [µg/ml]
Ampicillin (Amp)	100 (in H ₂ O _{bidest})	-	100
Chloramphenicol (Cm)	30 (in EtOH)	6-9	30
Kanamycin (Kan)	50 (in H ₂ O _{bidest})	25	50

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung von Bakterien

2.2.1.1 *Escherichia coli*

Die Kultivierung von *E. coli* Wildtyp bzw. plasmidtragenden Stämmen (Tab. 2.14 und 2.15) erfolgte zunächst mit Bakterienmaterial aus Glycerinkryokulturen auf entsprechenden LB-Agarplatten (gegebenenfalls mit geeignetem Antibiotikum versetzt). Die beimpften Platten wurden 18-24 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert und bis zu einem Monat im Kühlschrank aufbewahrt. Bei Bedarf wurden die Platten zum Inokulieren von Flüssigkulturen (Vorkulturen oder Übernacht-Kulturen) verwendet. Mit einer sterilen Impföse wurde dazu Bakterienmaterial in LB-Bouillon mit entsprechendem Antibiotikum im Fall von plasmidhaltigen Stämmen suspendiert und über Nacht bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. Das bakterielle Wachstum wurde durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm verfolgt. Zur Expression eines *in trans* enthaltenen Gens wurde eine 1:100 verdünnte Hauptkultur aus der Vorkultur angeimpft und nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0.6 mit IPTG bzw. im Fall von pGKJE8 mit Arabinose oder Tetrazyclin induziert (s. Tab. 2.28). Die Expression erfolgte bei 20 °C über Nacht oder wurde im Fall von 6xHis-fusionierten Proteinen bei 37 °C für 3-5 h fortgeführt.

2.2.1.2 *Legionella pneumophila*

Aus Glycerinkryokulturen wurden die *Legionella*-Stämme mittels einer sterilen Impföse auf BCYE-Agar bzw. BCYE-Agar mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen und für 2 Tage bei 37 °C bebrütet (Mutterplatten). Die Mutterplatten wurden im Kühlschrank bis zu einem Monat gelagert und dienten dem Überimpfen auf neue BCYE-Agarplatten (Tochterplatten), welche für 1-3 Tagen bei 37 °C bebrütet wurden. Für die Arbeit mit plasmidtragenden Legionellen-Stämmen erfolgte das Anlegen von Tochterplatten auf BCYE-Agar mit entsprechenden Antibiotikakonzentrationen (s. Tab. 2.18). Wildtypstämme bzw. Stämme ohne Plasmid wurden auf BCYE-Agar gezüchtet.

Flüssigkulturen wurden mit Bakterienmaterial von der entsprechenden Tochterplatte mittels eines sterilen Wattetupfers in BYE-Bouillon (mit/ohne Antibiotikum) angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 250 rpm inkubiert (Vorkultur mit OD₆₆₀ zwischen 0.8-1.8). Die Hauptkultur wurde nach Bestimmung der photometrischen Dichte bei 660 nm auf eine OD₆₆₀ von 0.3 eingestellt und

bei 37 °C und 250 rpm in der Regel bis zur späten exponentiellen Phase ($OD_{660} \sim 1.8-1.9$) kultiviert.

2.2.1.3 Herstellung von Glyzerinkryokulturen

Für die Langzeitaufbewahrung von *E. coli* und *L. pneumophila* wurde die jeweilige Kultur über Nacht in entsprechendem Flüssigmedium angezogen (s. 2.2.1.2 und 2.2.1.1). Zum Anlegen einer Glyzerinkryokultur wurde anschließend die Übernachtskultur 1:1 mit sterilem 80%igem (v/v) Glycerin vermischt und bei -80 °C gelagert.

2.2.2 Herstellung und Transformation kompetenter Zellen

2.2.2.1 Herstellung und Transformation elektrokompetenter *L. pneumophila* Zellen

Für die Herstellung elektrokompetenter *L. pneumophila* Zellen wurde Bakterienmaterial von einer 2 Tage auf BCYE-Agar gewachsenen Kultur mit einer sterilen Impföse entnommen, in BYE-Bouillon resuspendiert und 1 ml der auf $OD_{660} \sim 1.8$ eingestellten Kultur bei 4.500 x g für 5 min bei 4 °C abzentrifugiert. Das gewonnene Zellpellet wurde dreimal mit eiskaltem, sterilem 10%igem (v/v) Glycerin gewaschen und anschließend in 50 µl 10%igem (v/v) Glycerin resuspendiert. Die 25 µl Aliquots wurden direkt für die Elektroporation verwendet oder bis zum nächsten Gebrauch bei -80 °C gelagert.

Für die Elektroporation wurden 20 µl elektrokompetente *L. pneumophila* Zellen mit 20 ng Plasmid-DNA vermischt und anschließend im Elektroporationsgerät bei 330 µF, 400 DC Volt und 4 kΩ transformiert. Nach der Inkubation der frisch transformierten Zellen in 2 ml BYE-Medium bei 37 °C und 250 rpm für 4 h erfolgte das Ausplattieren auf BCYE-Agar mit entsprechendem Antibiotikum. Die Platten wurden bei 37 °C für 2-3 Tage inkubiert, bis deutlich sichtbar gewachsene Kolonien auf dem antibiotikahaltigem Selektivmedium zu sehen waren.

2.2.2.2 Herstellung und Transformation chemisch kompetenter *E. coli* Zellen

Die Erzeugung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen erfolgte nach modifiziertem Standardprotokoll (Sambrook & Russell, 2001). Aus einer über Nacht gewachsenen Kultur (s. 2.2.1.1) wurden 25 ml LB-Medium 1:100 überimpft und bei 37 °C für etwa 2 h und 250 rpm inkubiert bis die mittlere log-Phase erreicht wurde. Nach der Zentrifugation bei 5.000 x g, 5 min und 4 °C wurde das Zellpellet in 12,5 ml steriler, eiskalter 100 mM $CaCl_2$ -Lösung resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach erneutem Pelletieren der Zellen durch Zentrifugation wurden diese in 1 ml eiskalter 100 mM $CaCl_2$ -Lösung resuspendiert. 80 µl der Zellsuspension wurden im Folgenden mit 50 ng Plasmid-DNA vermischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach 1-minütigem Hitzeschock bei 42 °C im Wasserbad erfolgte eine erneute Abkühlung der Zellen auf

Eis für etwa 2 min. Der Transformationsansatz wurde dann in 37 °C vorgewärmtes SOC-Medium überführt und für 1 h bei 37 °C geschüttelt. Zur Selektion wurden die Zellen auf LB-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht kultiviert.

2.2.3 Nukleinsäure-Techniken

2.2.3.1 Isolierung extrachromosomaler DNA

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus 3 ml *E. coli* Übernachtskulturen wurde das *QIAprep Spin Miniprep Kit* (QIAGEN) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Vorschrift des Herstellers. Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt.

2.2.3.2 Nukleinsäureverdau mittels Restriktionsendonukleasen

Zur Spaltung von Plasmid-DNA bzw. DNA-Fragmenten wurden Restriktionsenzyme (Endonukleasen) verwendet, welche spezifisch vier bis acht Basenpaare in einem DNA-Strang erkennen und in einer meist palindromen Zielsequenz schneiden. Alle in dieser Arbeit eingesetzten Restriktionsenzyme wurden von New England Biolabs (NEB) erworben und mit den dazugehörigen Puffern in den jeweiligen Reaktionen eingesetzt. Für die Restriktion wurde 1 µg Plasmid-DNA bzw. DNA-Fragment mit 10 Einheiten des entsprechenden Restriktionsenzym in einem Reaktionsvolumen von 20 µl eingesetzt und in Abhängigkeit der für das jeweilige Enzym vorgeschriebenen Temperatur für 4 h inkubiert. Im Anschluss erfolgte zur Überprüfung der Restriktion die Analyse der Proben durch Auftrennung auf einem 1%igen (w/v) Agarosegel (s. 2.2.3.6).

2.2.3.3 Dephosphorylierung von Plasmiden

Um eine Religation des Vektors zu vermeiden, wurde bei Restriktionen mit nur einem Enzym eine Dephosphorylierungsreaktion des verdauten Vektors mit Antarctic Phosphatase (AP, NEB) durchgeführt. Hierzu wurde dem hitzeinaktivierten Restriktionsansatz 1x AP-Puffer und 5 Einheiten AP-Enzym zugegeben und für 60 min bei 37 °C inkubiert. Nach anschließender Inaktivierung bei 65 °C für 10 min wurden die Puffer- und Enzymreste mittels des *QIAquick PCR Purification Kit* (QIAGEN) aus dem Reaktionsansatz entfernt. Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm für den Ligationsansatz bestimmt.

2.2.3.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Für 10 µl Ligationsansatz wurden 50 ng Plasmid-DNA im molaren Verhältnis 1:3 zum DNA-Fragment mit 400 Einheiten T4 DNA-Ligase (NEB) und 1x Ligase Puffer vermischt und für 16-18 h bei 16 °C inkubiert. Nach anschließender Inaktivierung des Enzyms bei 65 °C für 10 min

und Ethanol (EtOH)-Fällung (s. 2.2.3.5) erfolgte die Transformation in entsprechende Bakterienstämme (s. 2.2.2).

2.2.3.5 Fällung von Nukleinsäuren

Die zu fällende DNA wurde mit einer Endkonzentration von 0,3 M Natriumazidlösung pH 7,0 und dem 2,5fachen Volumenanteil von 96%igem (v/v) EtOH vermischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation für 15 min bei 16.000 x g und 4 °C wurde der Überstand verworfen und die präzipitierte DNA mit 70%igem (v/v) EtOH gewaschen. Nach erfolgter Trocknung des DNA-Pellets für etwa 15 min bei 37 °C wurde dieses in Rotipuran Wasser resuspendiert.

2.2.3.6 Nukleinsäure-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Nukleinsäuren erfolgte mit Hilfe einer Agarose-Gelelektrophorese. Bei diesem Verfahren bewegen sich die Nukleinsäuren proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichtes (MG) in einem elektrischen Feld zur Kathode. Die Gelmatrix bestand aus 1%iger Agarose in 1x TAE-Puffer. Als Elektrophoresepuffer diente ebenfalls 1x TAE-Puffer. Die Proben wurden in 1x DNA-Probenpuffer aufgenommen und bei einer Spannung von 100 bis 120 V aufgetrennt. Als DNA-Standard diente der *Gene Ruler DNA Laddermix* (Thermo Scientific). Für die Analyse der Gele mit einem UV-Transilluminator bei 254 nm wurde der Gelmatrix 0,2 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt.

2.2.3.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation definierter DNA-Abschnitte (*template*) aus Plasmid-DNA wird durch die PCR-Reaktion ermöglicht. Die exponentielle Vervielfältigung von DNA-Abschnitten erfolgte mittels Oligonukleotidprimern (Tab. 2.11) und einer thermostabilen DNA-Polymerase. Für in dieser Arbeit durchgeführte Klonierungen wurden die *Pfu turbo* bzw. die *Phusion® High Fidelity* DNA-Polymerase zur Amplifizierung von Plasmiden und die *Pfu* Polymerase zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten eingesetzt. Zur Analyse positiver Klone mittels Kolonie-PCR wurde die *Taq* DNA-Polymerase verwendet. Die Durchführung erfolgte in einem Thermocycler mit beheizbarem Deckel. Die Plasmid- bzw. Kolonie-DNA wurde mit einem Reaktionsansatz versetzt, wobei das Ansatzvolumen je nach Anwendung zwischen 25 bis 50 µl variierte. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes ist den Tabellen 2.19 und 2.20 zu entnehmen.

Tab. 2.19: Reaktionsansatz einer Standard- bzw. Kolonie-PCR

Komponente	Volumen [µl]	Stammlösung	Endkonzentration
DNA	20 ng Plasmid-DNA bzw. 1 Kolonie (Kolonie-PCR)	-	-
Polymerase-Puffer	2,5	10x	1x
dNTPs	0,25	10 mM pro Nukleotid	0,1 mM pro Nukleotid
Oligonukleotid I	0,25	50 µM	0,5 µM
Oligonukleotid II	0,25	50 µM	0,5 µM
DNA-Polymerase	1 (<i>Pfu</i>) bzw. 0,25 (<i>Taq</i>)	2,5 U/µl bzw. 5 U/µl	0,1 U/µl bzw. 0,05 U/µl
Rotipuran H ₂ O	zu 25 µl Gesamtvolumen	-	-

Tab. 2.20: Reaktionsansatz zur Amplifizierung von Plasmiden

Komponente	Volumen [µl]	Stammlösung	Endkonzentration
DNA	20 ng Plasmid-DNA	-	-
Polymerase-Puffer	10 (<i>Phusion</i>) bzw. 5 (<i>Turbo Pfu</i>)	5x bzw. 10x	1x
dNTPs	1	10 mM pro Nukleotid	0,2 mM pro Nukleotid
Oligonukleotid I	1	50 µM	1 µM
Oligonukleotid II	1	50 µM	1 µM
DNA-Polymerase	1	2 U/µl (<i>Phusion</i>) bzw. 2,5 U/µl (<i>Turbo Pfu</i>)	0,04 U/µl bzw. 0,05 U/µl
Rotipuran H ₂ O	zu 50 µl Gesamtvolumen	-	-

Eine typische PCR verläuft in mehreren definierten Temperaturstufen, die sich zyklisch wiederholen. Ein solches Programm besteht aus:

1. Initialem Denaturierungsschritt bei 95 °C
2. Denaturierung bei 95 °C
3. Hybridisierungsschritt (*Annealing*) bei 47 bis 60 °C
4. Polymerisationsschritt (Elongation) bei 72 °C
5. Abschließende Polymerisationsphase bei 72 °C

Die Schritte 2. bis 4. wiederholten sich bis zu 30x. Die Hybridisierung der Primer (Oligonukleotide) an den DNA-Einzelstrang erfolgte bei verschiedenen Temperaturen, welche sich spezifisch nach den Schmelztemperaturen (T_m) der verwendeten Primer richteten. Die Polymerisationszeit ist von der verwendeten Polymerase und von der Länge des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes abhängig. Als Schätzwert wurde hier eine Syntheserate von 1000 kb/min angenommen.

Für die Kolonie-PCR wurde eine mit einem sterilen Zahnstocher gepickte Kolonie in einem PCR-Gefäß mit 21,5 µl Rotipuran Wasser für 10 min bei 99 °C im Thermocycler lysiert. Anschließend wurde ein PCR-Mastermix, der die übrigen Komponenten enthielt, zugegeben (s. Tab. 2.19) und das in Tabelle 2.21 aufgeführte PCR-Programm verwendet.

Tab. 2.21: Standard-PCR-Programm

Reaktionsschritt	Zyklusanzahl	Temperatur [°C]	Zeit
Denaturierung	1	95	4 min
Denaturierung	30	95	40 s
<i>Annealing</i>	30	47-60	40 s
Elongation	30	72	1 kb/min
Finale Elongation	1	72	10 min

Bei der Amplifizierung von Plasmiden wurde an die PCR-Reaktion ein Restriktionsschritt mit *DpnI* angeschlossen, welches das methylierte Ausgangsplasmid verdaut. Dazu wurde der Reaktionsansatz mit 1 µl *DpnI* vermischt und für 1 h bei 37 °C inkubiert.

Die resultierenden PCR-Produkte wurden auf 1%igen (w/v) Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt und gegebenenfalls weiter gereinigt.

2.2.3.8 Einführen von Punktmutationen in Plasmid-DNA

Zum Einfügen von Punktmutationen in einem Plasmid (ortsspezifische Mutagenese) wurde das *QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene) nach den Angaben des Herstellers eingesetzt. Es wurde folgender Ansatz gewählt:

Tab. 2.22: Reaktionsansatz für *QuikChange Site-Directed Mutagenesis*

Komponente	Eingesetzte Menge
Plasmid-DNA	50 ng
10x Reaktionspuffer-Puffer	5 µl
dNTPs	1 µl
Oligonukleotid I	125 ng
Oligonukleotid II	125 ng
<i>Pfu Turbo</i> DNA-Polymerase	1 µl
Rotipuran H ₂ O	zu 50 µl Gesamtvolumen

Die Parameter des PCR-Programms wurden ebenfalls der Vorschrift des Herstellers entnommen.

Tab. 2.23: PCR-Programm für *QuikChange Site-Directed Mutagenesis*

Reaktionsschritt	Zyklusanzahl	Temperatur [°C]	Zeit [s]
Denaturierung	1	95	30
Denaturierung	16	95	30
<i>Annealing</i>	16	47-60	60
Elongation	16	68	1 min/kb

Im Anschluss an die PCR-Reaktion wurde der Ansatz für 2 min auf Eis gekühlt. Nach der Zugabe von 1 µl *DpnI* erfolgte die Inkubation des Reaktionsansatzes bei 37 °C für 1 h, um die methylierte DNA des Ausgangsplasmides zu verdauen. Von diesem Verdau wurde 1 µl für die Transformation in 50 µl *E. coli* XL1-Blue superkompetente Zellen eingesetzt, die wie unter 2.2.2.1 beschrieben erfolgte. Zur Selektion wurden die Zellen auf Humanblut-Agarplatten (s. Tab. 2.16) ausplattiert und über Nacht kultiviert. Von den gewachsenen Klonen ohne Hämolysehof wurde zunächst mittels Kolonie-PCR (s. 2.2.3.7) überprüft, ob das *plaB*-Gen vorhanden war, um anschließend von der isolierten Plasmid-DNA eine Sequenzierung zur Ermittlung des Basenaustausches innerhalb des *plaB*-Gens durchzuführen.

2.2.3.9 Zufällige Mutagenese mittels *error-prone* PCR

Um in das *plaB*-Gen aus *L. pneumophila* zufällige Mutationen einzuführen, wurde die *error-prone* PCR-Methode im FlexCycler (Analytik Jena) durchgeführt. Diese Methode basiert auf der natürlich hohen Fehlerrate der *Taq* DNA-Polymerase ($\sim 285 \times 10^{-6}$ Basen, NEB). Dazu wurde das *plaB* enthaltene Plasmid pJB04 mit Hilfe der entsprechenden *Taq* DNA-Polymerase (NEB) amplifiziert. Die dafür in der Literatur beschriebenen Schemata für den Reaktionsansatz und das PCR-Programm wurden abgewandelt und sind den nachfolgenden Tabellen zu entnehmen (Rasila *et al.*, 2009, Chusacultachai & Yuthavong, 2004, Cirino *et al.*, 2003).

Tab. 2.24: Reaktionsansatz für *error-prone* Mutagenese

Komponente	Eingesetzte Menge
Plasmid-DNA (pJB04)	50 ng
10x ThermoPol-Puffer	5 µl
dNTPs	1 µl
Oligonukleotid I (pBCKSf)	125 ng
Oligonukleotid II (pBCKSr)	125 ng
<i>Taq</i> DNA-Polymerase	1 µl
Rotipuran H ₂ O	zu 50 µl Gesamtvolumen

Tab. 2.25: PCR-Programm für *error-prone* Mutagenese

Reaktionsschritt	Zyklusanzahl	Temperatur [°C]	Zeit
Denaturierung	1	95	4 min
Denaturierung	20	95	40 s
<i>Annealing</i>	20	54	40 s
Elongation	20	72	6 min
Finale Elongation	1	72	10 min

Die PCR-Ansätze wurden einem *DpnI* Verdau unterzogen (s. 2.2.3.8), vereinigt und mittels des *PCR Purification Kit* (QIAGEN) gereinigt. Im Anschluss erfolgte die Transformation von 10 µl

gereinigtem PCR-Ansatz in DH5 α (s. 2.2.2.2), das Ausplattieren der Zellen auf Humanblut-Agarplatten mit Chloramphenicol zur Selektion und die Kultivierung über Nacht bei 37 °C.

2.2.3.10 Sequenzierungs-Polymerase-Kettenreaktion

Die DNA-Sequenzierung basierend auf der Didesoxy-Methode nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977) wurde unter Verwendung des „ABI BigDye Terminator 3.1 Premix“ durchgeführt. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes und der Ablauf des PCR-Programms ist den nachfolgenden Tabellen zu entnehmen.

Tab. 2.26: Reaktionsansatz für Sequenzierung

Komponente	Volumen [μl]	Stammlösung	Endkonzentration
DNA	variabel	variabel	~300 ng
ABI-Puffer	1,5	5x	0,75x
BigDye 3.1	1	-	-
Oligonukleotid	0,5	10 μM	0,5 μM
Rotipuran H ₂ O	zu 10 μl Gesamtvolumen	-	-

Tab. 2.27: PCR-Programm für Sequenzierung

Reaktionsschritt	Zyklusanzahl	Temperatur [°C]	Zeit
Denaturierung	1	96	1,5 min
Denaturierung	25	96	10 s
Annealing	25	54	5 s
Elongation	25	60	4 min

Die elektrophoretische Auftrennung und Fluoreszenzdetektion wurde durch Mitarbeiter des Robert Koch-Institutes durchgeführt. Die Analyse der Daten erfolgte mit Hilfe der *Lasergene SeqMan* Software (s. Tab. 2.1).

2.2.4 Proteinanalytik

2.2.4.1 Proteinfällung mittels Trichloressigsäure (TCA)

Proteinproben, welche eine zu geringe Proteinkonzentration für eine SDS-PAGE aufwiesen oder deren Volumenverhältnis angeglichen werden musste, wurden mit einer TCA-Fällung aufkonzentriert. Dazu wurde der Proteinlösung eine 100%ige (w/v) TCA-Lösung bis zu einer Endkonzentration von 13% (v/v) zugesetzt, der Ansatz für 1 h auf Eis inkubiert und anschließend zentrifugiert (16.000 x g, 10 min, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 1 ml eiskaltem Aceton gewaschen. Nach dem Trocknen des Pellets wurde dieses in 20 mM Tris-HCl pH 8,0 oder in eine 8 M Harnstofflösung aufgenommen.

2.2.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Methode von Bradford (1976) (Bradford, 1976) mittels *Roti Nanoquant* (Roth) nach den Angaben des Herstellers. Als Standard zur Erstellung der Eichgeraden diente Rinderserumalbumin (BSA). Die Auswertung der Proteinbestimmung wurde mit einem *Tecan Sunrise* (Tecan) und der Software Magellan V5.03 durchgeführt.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration eines gereinigten Proteins konnte mittels der direkten UV-Absorptionsmethode bestimmt werden. Aromatische Verbindungen haben bei 280 nm ein Absorptionsmaximum. Da PlaB aromatische Aminosäuren enthält, wurde dieses Protein bei 280 nm quantitativ mit Hilfe des *NanoDrop* photometrisch bestimmt. Die Proteinkonzentration für PlaB wurde dann mit Hilfe der bekannten Absorption für 1 g/l berechnet, welche das Programm *ProtParam* (<http://web.expasy.org/cgi-bin/protparam>) aus der Proteinsequenz berechnete.

2.2.4.3 Eindimensionale (1D)- SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung der Proteine erfolgte mittels 7,5%-iger, 10%-iger bzw. 12,5%-iger Polyacrylamidgele, wobei in der porösen Polyacrylamidmatrix negativ geladene Protein-SDS-Komplexe im elektrischen Feld nach ihrem MG aufgetrennt werden. Zur Probenvorbereitung wurden die Proteinansätze mit 1x SDS-PAGE Probenpuffer (s. Tab. 2.5) versetzt und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Die Elektrophorese erfolgte wie bei Laemmli (1970) beschrieben (Laemmli, 1970). Dazu wurden die Proben zunächst im Sammelgel (s. Tab. 2.5) konzentriert und im Trenngel (s. Tab. 2.5) bei konstanten 150 V elektrophoretisch aufgetrennt. Als Proteinstandard diente der Marker *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* bzw. *PageRuler™ Unstained Protein Ladder*. Als Laufpuffer wurde 1x SDS-Laufpuffer (s. Tab. 2.5) verwendet. Zur Detektion der Proteine im Gel diente die Coomassie-Färbung (s. 2.2.4.4) als Färbemethode.

2.2.4.4 Coomassie-Färbung von Polyacrylamidgelen

Die Coomassie-Färbung von Proteingelen erlaubt die Visualisierung kleiner Proteinmengen (20-50 ng/0,5 cm Bande). Daher wurde im Anschluss an die Elektrophorese das Gel über Nacht in kolloidaler Coomassie-Färbelösung nach Vorschrift des Herstellers (Roti®-Blue, Roth) auf einem Schwenker inkubiert. Zur Entfärbung des Hintergrundes wurde das Gel für 5-10 h in ddH₂O gespült und anschließend zur Dokumentation gescannt.

2.2.4.5 Western Blot, Immundetektion und Nachweis mittels Ponceau

Die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteinproben wurden in einer Transferapparatur (Pharmacia) mit Hilfe der „Semi-dry“-Methode auf eine 0,45 µm Polyvinylidenfluorid (PVDF)-

Transfermembran (Millipore) übertragen. Die verwendete PVDF-Membran wurde zunächst für ca. 1 min unter Schwenken mit 100%igem Methanol aktiviert und anschließend in Wasser äquilibriert. Der Transfer erfolgte unter Verwendung eines Transferpuffers (s. Tab. 2.5) bei 0,8 mA/cm² für 1 h. Danach wurde die Membran in TBST-Puffer (s. Tab. 2.5) gespült. Um unspezifische Bindungen von Antikörpern zu reduzieren, war es notwendig, die Membran für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C in TBST mit 5% (w/v) Magermilchpulver (Fluka) zu blockieren. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte in der Blockierlösung (TBST; 5% (w/v) Magermilchpulver) für 1,5 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C. Dabei wurden die in Tabelle 2.10 aufgeführten Antikörper in den angegebenen Verdünnungen verwendet. Nach dreimaligem Waschen der Membran mit TBST für 8 min folgte die Inkubation mit dem entsprechenden sekundären Antikörper für 1 h bei Raumtemperatur sowie ein erneutes dreimaliges Waschen mit TBST. Es wurden die in Tabelle 2.10 genannten sekundären Antikörper in den angegebenen Verdünnungen verwendet.

Die weitere Behandlung der Membran ist abhängig vom verwendeten zweiten Antikörper. In dieser Arbeit erfolgte die Detektion der Antikörper mit Meerrettich-Peroxidase-Konjugat (HRP) mittels Entwicklerlösung von Pierce (SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate), wobei die Membran nach Vorschrift des Herstellers behandelt wurde. Die bei dieser Methode auftretende Chemilumineszenz wurde mit einer hochauflösenden CCD-Kamera im Chemilumineszenz-Imager (Vilber Lourmat) detektiert und mit dem Programm *Chemi-Capt* aufgezeichnet. Für die Quantifizierung der Western Blot Banden wurde das Programm ImageJ verwendet (<http://rsb.info.nih.gov/ij>).

An den Blotvorgang schloss sich gegebenenfalls der Nachweis von Proteinbanden mittels einer Ponceau S-Färbung an. Hierzu wurde die Membran ca. 2 min bei Raumtemperatur in 1x Ponceau S-Lösung geschwenkt. Sobald Proteinbanden sichtbar wurden, wurde die Lösung verworfen und die Membran bis zur Dokumentation in ddH₂O gelagert.

2.2.4.6 Identifizierung von Proteinbanden mittels Massenspektrometrie

Um Proteine, wie PlaB, näher zu analysieren oder zu identifizieren, wurden massenspektrometrische Analysen von Dr. Manfred Nimtz und Undine Felgenträger (Zelluläre Proteomforschung, HZI, Braunschweig) durchgeführt. Die MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation – Time Of Flight*) Spektren wurden zur Identifizierung von Proteinbanden aufgenommen. Dieser massenspektrometrischen Analyse ging ein Verdau der Proteinbanden mit Trypsin, eine Serinprotease, die Peptidbindungen nach den basischen Aminosäuren Arginin und Lysin hydrolytisch spaltet, voran. Die resultierenden Peptidfragmente wurden im Massenspektrometer Bruker Ultraflex *time-of-flight* (Bruker Daltonics, Bremen) entsprechend ihres Masse-zu-Ladungsverhältnisses aufgetrennt. Daraufhin erfolgte die Identifikation der

Proteine über das Programm *MASCOT Search* (Cottrell & London, 1999). Dieses Programm vergleicht die im Massenspektrometer analysierten Peptid-Spektren mit Spektren theoretischer Spaltungen von in einer Datenbank hinterlegten Proteinen. Aus einer statistischen Auswertung der Übereinstimmungen resultiert eine Auswahl an Proteinidentitäten, für die jeweils ein *Protein Score* angegeben wird. Je höher dieser Wert ist, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit für eine eindeutige Identifikation des Proteins (Cottrell & London, 1999). Zur Bestimmung des MG von PlaB wurden MALDI-TOF Analysen des in *L. pneumophila plaB1* exprimierten, gereinigten und in 100 mM Ammoniumacetat-Puffers pH 7,6 gelösten PlaB-Strep Proteins und ohne tryptischen Verdau durchgeführt.

2.2.4.7 N-Terminale Sequenzierung

Die N-terminale Sequenzierung, welche Beate Jaschok-Kentner (Molekulare Strukturbiologie, HZI, Braunschweig) durchführte, beruht auf dem Prinzip des Edman-Abbaus (Edman & Begg, 1967). Nach Koppelung des Edman-Reagenz Phenylisothiocyanat (PITC) an die N-terminale Aminogruppe des zu sequenzierenden Proteins wird diese durch Zugabe von Säure abgespalten. Durch Chromatographie können nun die abgespaltenen Aminosäuren im Vergleich mit Referenzproben identifiziert und quantifiziert werden. Zur Identifizierung der ersten 20 Aminosäuren erfolgte die N-terminale Sequenzierung von PlaB. Dazu wurden 200 pmol aus *L. pneumophila plaB1* gereinigtes PlaB-Strep (s. 2.2.5.2 b) auf eine PVDF-Membran geblottet und mit Ponceau S-Lösung gefärbt (s. 2.2.4.5). Der Hintergrund wurde mit ddH₂O entfärbt. Die sichtbare PlaB-Strep Bande wurde ausgeschnitten und mit dem ABI 494A Procise HT (Applied Biosystems) am HZI analysiert.

2.2.4.8 Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie

Der Circular dichroismus ist eine Methode zur Bestimmung des Anteils sekundärer Strukturen eines Proteins. Proteine werden dazu im UV-Bereich gemessen und zeigen bestimmte Absorptionscharakteristika in Abhängigkeit ihrer Sekundärstrukturelemente. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das gemessene Protein in CD-Puffer (10 mM NaH₂PO₄, pH 8,0, 10 mM NaCl, 5 mM DTT, 1 mM MgCl₂) auf 0,2 mg/ml verdünnt und ein Spektrum von 190 bis 220 nm bei 20 °C mit dem J-815 CD Spektrometer (Jasco) gefahren.

2.2.5 Expression und Reinigung von Proteinen

2.2.5.1 Proteinexpression in *E. coli* BL21 und *L. pneumophila plaB1*

Eine *E. coli* BL21 Expressionskultur mit entsprechendem Plasmid (s. Tab. 2.28 und 2.14) wurde zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase (OD₆₀₀ = 0.6) mit dem entsprechenden Induktor

induziert (s. Tab. 2.28) und nach etwa 18 h Schüttelinkubation bei 20 °C – 27 °C bzw. nach 3-5 h bei 37 °C (s. Tab. 2.28) für 10 min bei 6.000 x g und 4 °C pelletiert.

Eine *plaB*-Strep exprimierende *L. pneumophila plaB1* Kultur wurde aus der entsprechenden Vorkultur auf OD₆₆₀ = 0.3 verdünnt und bis zur spät-exponentiellen Phase (OD₆₆₀ = 1.9) bei 37 °C inkubiert (s. auch 2.2.1.2). Die Kultur wurde anschließend durch 10-minütiges Zentrifugieren bei 6.000 x g und 4 °C geerntet.

Tab. 2.28: zur Expression verwendete Induktoren und Expressionsbedingungen

Plasmid	Heterogen exprimiertes Fusionsprotein	Induktor	Endkonzentration des Induktors	Expressionsbedingungen
pKK2-3,5-6,8-16, 56-57	His-fusioniertes PlaB und Varianten	IPTG	1 mM	37 °C (3-5 h)
pKK1 + pG-KJE8	GST-PlaB + DnaK/ DnaJ/ GrpE oder GroEL/GroES	IPTG	0,1; 0,3 und 1 mM	37 °C (3-5 h)
		Arabinose	5 mg/ml	27 °C (3-8 h),
		Tetrazyklin	5 ng/ml	18 °C (ca. 18 h)
pKK4, 7, 18	MBP-PlaB	IPTG	0,1; 0,3 und 1 mM	27 °C (3-8 h) 18 °C (ca. 18 h)
pKK19, 21, 25-27	Strep-PlaB und C-terminal trunkierte bzw. punktmutierte Varianten	IPTG	2 mM	20 °C (ca. 18 h)

2.2.5.2 Reinigung mittels Affinitätschromatographie

a) Maltose-Bindeprotein (MBP)-fusioniertes PlaB

Für den Zellaufschluss wurde das Zellpellet einer MBP-*plaB* exprimierenden *E. coli* BL21 Kultur in 1/20 des ursprünglichen Kulturvolumens in CB-Puffer (s. Tab. 2.5) aufgenommen. Nach Zugabe von 1× Proteaseinhibitormix wurden die Zellen in drei Zyklen mittels des Emulsi-Flex-C3 Homogenisators (Avestin) bei 10.000 bis 15.000 psi lysiert. Die Abtrennung der Zelltrümmer und nicht aufgeschlossenen Zellen erfolgte durch Zentrifugation bei 4 °C und 37.000 x g für 20 min (Beckman Avanti J25, Rotor JA25.50). Der klare Überstand, der den löslichen Anteil des exprimierten Proteins aufwies, wurde für die affinitätschromatographische Reinigung weiterverwendet. Die Reinigung der Proteine erfolgte am *fast protein liquid chromatography* (FPLC)-System Äkta Prime. Dafür wurden die im Überstand enthaltenen mit MBP-Tag (43 kDa) markierten Proteine auf eine nach Herstellerangaben äquilibrierte MBPTrap HP Säule (1 ml, GE Healthcare) mit einer konstanten Flussrate von 1 ml/min geladen und mit dem entsprechenden Elutionspuffer (s. Tab. 2.5) eluiert. Bezüglich des Proteingehaltes relevante Fraktionen wurden anschließend mittels SDS-PAGE auf ihren Reinheitsgrad hin untersucht.

Abspalten des MBP-Tags mittels Enterokinase, Faktor Xa bzw. Prescission Protease:

Die Abspaltung der MBP-Fusion nach der Expression und Reinigung diente der Gewinnung des Zielproteins in seiner nativen Form. Enterokinase Protease spaltet spezifisch nach dem Lysin Rest in der Asp-Asp-Asp-Asp-Lys Erkennungssequenz. Für den Verdau wurden 0,005-0,5% (w/w) dieser Protease im Verhältnis zu MBP-PlaB eingesetzt und bei 23 °C, 16 °C bzw. 8 °C für 2 h, 4 h und 24 h inkubiert. Die Faktor Xa Protease spaltet nach dem Arginin Rest in seiner bevorzugten Erkennungssequenz Ile-Glu/Asp-Gly-Arg. Für den Verdau wurden 0,5-1 µg Faktor Xa pro 50 µg Fusionsprotein nach Anleitung des Herstellers (NEB) eingesetzt. Die Spaltung wurde bei 4 °C und 16 °C für 2 h, 4 h, 6 h bzw. 24 h durchgeführt. Die Prescission Protease spaltet spezifisch nach dem Glutamin Rest in der Erkennungssequenz Leu-Glu-Val-Leu-Phe-Gln-Gly-Pro. Für die Spaltung wurden 80 µl Protease in Schneidepuffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH 7,5) eingesetzt, um das gebundene MBP-PlaB direkt auf der Säule zu verdauen. Der Verdau wurde für 4 h bei 4 °C durchgeführt. Anschließend wurde die Säule mit CB-Puffer gewaschen und wie oben beschrieben eluiert. Der Erfolg des Verdaus wurde mittels SDS-PAGE untersucht.

Tab. 2.29: Übersicht der verwendeten Proteasen zur Abspaltung des MBP-Tags

Protease	Plasmid	Erkennungssequenz	Eingesetzte Menge	Inkubationszeit	Inkubationstemperatur
Enterokinase	pKK4	Asp-Asp-Asp-Asp-Lys▼	0,005-0,5% (w/w)	2 h, 4 h, 24 h	23 °C, 16 °C, 8 °C
Faktor Xa	pKK7	Ile-Glu/Asp-Gly-Arg▼	0,5-1 µg	2 h, 4 h, 6 h, 24 h	4 °C, 16 °C
Prescission	pKK18	Leu-Glu-Val-Leu-Phe-Gln▼-Gly-Pro	80 µl	4h	4 °C

b) Strep-fusioniertes PlaB

Die Resuspension des Zellpellets einer *E. coli* BL21 oder *L. pneumophila* *plaB1* Kultur mit Strep-markierten (~1 kDa, 8 Aminosäuren) Proteinen und dessen Aufschluss erfolgte wie unter 2.2.5.2 (a) beschrieben mit Ausnahme des Puffers (Waschpuffer, s. Tab. 2.5). Die Reinigung erfolgte bei 4 °C unter Verwendung der StrepTactin Superflow High Capacity Matrix (IBA) nach Herstellervorschrift. Der Proteingehalt der Elutionsfraktionen wurde mittels des *NanoDrop* Photometers bestimmt (s. 2.2.4.2). Der Reinheitsgrad des Proteins wurde mittels SDS-PAGE untersucht.

2.2.5.3 Reinigung mittels Anionenaustauschchromatographie (AEC)

Mithilfe der Anionenaustauschchromatographie (*anion exchange chromatography*, AEC) werden Proteine entsprechend ihrer Eigenladung aufgetrennt. Die Chromatographiesäulen besitzen positiv geladene Gruppen an der Matrix, mit denen sie über elektrostatische Wechselwirkungen negativ

geladene Proteine binden. Für diese Arbeit wurde eine HiTrapQ HP (1 ml, GE Healthcare) verwendet, welche an das FPLC-System Äkta Prime angeschlossen wurde. Die Puffer der Anionenaustauschchromatographie wurden so gewählt, dass ihr pH-Wert mindestens eine pH-Einheit über dem pI des zu reinigenden Proteins (PlaB) liegt. Da MBP einen sauren pI von 4,88 und PlaB einen basischen pI von 8,38 besitzt, müssten beide Proteine an der Matrix binden und sich mittels des Ionenstärkegradienten trennen lassen. Für die Äquilibration der AEC-Säule wurden fünf Säulenvolumen des Startpuffers (20 mM Tris-HCl pH 9,5, 1 mM EDTA) verwendet. Anschließend fand die Säulenbeladung mit einer Flussrate von 0,7 ml/min statt. Nach etwa zehn Säulenvolumen Waschen mit dem Startpuffer wurde die Basis-UV-Linie erreicht und die Elution über 50 Säulenvolumen bei einem linearen Gradienten von 0 bis 1 M NaCl des Elutionspuffers (Startpuffer mit 1 M NaCl) vollzogen. Die fraktionierten Eluate wurden im SDS-Gel auf den Erfolg der Trennung der gewünschten Proteine überprüft.

2.2.5.4 Reinigung mittels Größenausschlusschromatographie (SEC)

Die Größenausschlusschromatographie (*size exclusion chromatography*, SEC) trennt Proteine ihrer Größe nach auf. Durch eine Matrix quervernetzter Polymere wandern große Moleküle schneller und bleiben weniger in den Hohlräumen hängen als kleinere, woraus sich eine längere Retentionszeit für kleinere Moleküle ergibt. Diese Methode wurde eingesetzt, um Proteingemische als zweiten Reinigungsschritt nach der Affinitätschromatographie zu trennen und um den Oligomerisierungszustand eines Proteins zu analysieren. Für diese Arbeit wurde eine an ein Äkta explorer System gekoppelte analytische Superdex 200 10/300 Säule (GE Healthcare) verwendet. Alle Arbeiten wurden bei 6 °C durchgeführt. Die Äquilibration der Säule wurde mit 100 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM NaCl bzw. 50 mM HEPES pH 7,5, 100 mM NaCl durchgeführt. Für die Analyse bzw. weitere Reinigung des entsprechenden Zielproteins wurde 500 µl 1 mg/ml Protein auf die Säule geladen. Die Proben wurden vor dem Säulenauftrag für 10 min bei 16.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Die Beladung und Elution erfolgte bei konstanter Flussrate von 0,5 ml/min nach Herstellervorschrift. Die Eluate wurden fraktioniert und anschließend mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Zur Kalibrierung der Säule wurden Proteinstandards der Firma Sigma verwendet, um das MG der zu untersuchenden Proteine zu kalkulieren.

2.2.6 Herstellung und Präadsorption polyklonaler Antikörper

Für die Generierung polyklonaler Antikörper wurde die rekombinant exprimierte und gereinigte enzymatisch inaktive Punktmutante Strep-PlaB_{D203N} eingesetzt (s. 2.2.5). Die Firma BioGenes GmbH (Berlin) übernahm die Herstellung des polyklonalen Antiserums gegen PlaB aus

Kaninchen. Dazu wurden der Firma 1 ml 2 mg/ml Protein zur Verfügung gestellt. Das so gewonnene Serum wurde gegen das Lysat der *L. pneumophila plaB* Mutante bzw. von *E. coli* BL21 1:1 über Nacht und bei 4 °C rotierend präadsorbiert, um unspezifische Bindungen des α -PlaB Antikörpers zu eliminieren. Das jeweilige Bakterienlysat wurde hierfür wie unter 2.2.10 beschrieben hergestellt. Nach Zentrifugation des Lysat-Serum-Gemisches bei 16.000 x g und 4 °C für 10 min konnte der Überstand für Western Blot Analysen eingesetzt werden. Dementsprechend wurden im Rahmen dieser Arbeit Zelllysate/Proteine aus *Legionella* mit dem *L. pneumophila plaB*-Mutante präadsorbierten α -PlaB Antiserum und Zelllysate/Proteine aus *E. coli* mit dem BL21 präadsorbierten Antiserum untersucht.

2.2.7 Analytische Ultrazentrifugation (AUZ)

Die analytische Ultrazentrifugation (AUZ) ist eine Methode, bei der mittels einer hochtourig drehenden Zentrifuge die Sedimentation von Proteinen verfolgt wird. In dieser Arbeit wurde die AUZ zur Charakterisierung des oligomeren Zustandes von PlaB in Lösung eingesetzt und in Kooperation mit PD Dr. Ute Curth (MHH, Hannover) durchgeführt. Zur Bestimmung des oligomeren Zustandes wurde die Methode der Sedimentations-Geschwindigkeitszentrifugation (*Sedimentation velocity*, SV) angewandt. Hierbei ist die Bestimmung des Sedimentationskoeffizienten ($c(s)$) zur Charakterisierung hydrodynamischer Eigenschaften eines Proteins bzw. Proteinkomplexes von Bedeutung (Lebowitz *et al.*, 2002). Die SV-Experimente wurden in einer Beckman Coulter ProteomeLab XL-I analytischen Ultrazentrifuge mit einem An-Ti Rotor bei 10 °C sowie 40.000 rpm und der dazugehörigen Software ProteomeLab XL-I GUI Version 6.0 durchgeführt. Die Datenanalyse erfolgte mit dem Programm SEDFIT, welches die diffusionskorrigierten differentiellen $c(s)$ -Verteilungen berechnet (Schuck, 2000). Die Sedimentations-Diffusions-Gleichgewichtszentrifugation (*Sedimentation equilibrium*, SE) wurde angewendet, um die Molmasse von PlaB zu bestimmen. SE-Experimente wurden bei 4 °C mit einem An-50 Ti Rotor in der Beckman Optima XL-A analytischen Ultrazentrifuge und der dazugehörigen Analysesoftware Version 3.0 durchgeführt. Die Proben wurden bei 4.000, 6.000 und 8.000 rpm solange zentrifugiert bis keine Veränderung im Konzentrationsgradienten mehr beobachtet wurde (etwa 12 h). Die Datenanalyse erfolgte mit dem Programm BPCFIT (Wyszomirski *et al.*, 2012). Die Konzentrationsprofile wurden bei 280 und 230 nm gemessen. Für die SV-Experimente wurden Proteinkonzentrationen von 5,4 bis 24,4 μ M des gegen 100 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM NaCl und 1 mM EDTA dialysierten Strep-PlaB eingesetzt. Für die SE-Experimente mit niedrigeren Proteinkonzentrationen (0,13 bis 1,1 μ M) und für die SE-Experimente wurde Strep-PlaB verwendet, welches zusätzlich mittels SEC gereinigt wurde (s.

2.2.5.4). Die Proteinkonzentrationen wurden spektrophotometrisch über den Absorptionskoeffizienten bei 280 nm mit dem Programm SEDNTERP bestimmt (Laue, 1992). Des Weiteren wurden Sedimentations-Geschwindigkeitsläufe mit DyLight 488 markiertem Strep-PlaB bei 10 °C und 40.000 rpm durchgeführt, um die oligomeren Zustände von PlaB im nanomolaren Konzentrationsbereich zu erfassen. Hierfür wurde ein Fluoreszenzdetektionssystem (AU-FDS, Aviv Biomedical, NJ, USA) nachträglich in die Beckman Ultrazentrifuge eingebaut. Das affinitätschromatographisch gereinigte Strep-PlaB wurde mit dem Markierungsreagenz DyLight 488 NHS Ester nach Herstellervorschrift in 50 mM HEPES pH 7,2, 100 mM NaCl unspezifisch an Lysinreste bzw. freie Aminogruppen markiert. Um das überschüssige Markierungsreagenz zu entfernen, wurde im Anschluss SEC (s. 2.2.5.4) durchgeführt. Für die SV-Experimente wurden Proteinkonzentrationen im Bereich von 0,57 μ M bis 0,3 nM eingesetzt. Jeder Verdünnung wurde 1 μ M BSA in HEPES-Puffer zugesetzt, um Interaktionen von markiertem Strep-PlaB mit der Gefäßwand zu vermeiden. Die Konzentrationsprofile wurden mittels AU-FDS bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm gemessen. Die Emission wurde über einen dichroitischen Langpassfilter detektiert. Die Datenerfassung erfolgte über die AOS Software (Aviv Biomedical, NJ, USA). Die Datenanalyse erfolgte wiederum mit dem Programm SEDFIT.

2.2.8 Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS)

Die Röntgenkleinwinkelstreuung (*small angle X-ray scattering*, SAXS) erlaubt eine strukturelle Charakterisierung von Proteinen/Proteinkomplexen in Lösung und gibt Aufschluss über deren Form und Gestalt. Da die Auflösungsgrenze bei 10 Å liegt, ist die Bestimmung der atomaren Struktur mit dieser Methode jedoch nicht möglich. Die Messungen wurden in Kooperation mit dem EMBL (Hamburg) am Speicherring PETRA III des DESY (Deutsches Elektronen Synchrotron), Strahlengang BioSAXS P12, unter Betreuung von Prof. Manfred Rössle durchgeführt. Es wurden rekombinant exprimiertes und affinitätschromatographisch gereinigtes Strep-PlaB sowie die drei C-terminal verkürzten Varianten (Strep-PlaB_{aa1-459}, Strep-PlaB_{aa1-464}, Strep-PlaB_{aa1-469}), vermessen (s. 2.2.5.1 und 2.2.5.2). Die SAXS-Parameter, wie z.B. der Gyrationradius (R_G) und die Molekularmasse des Proteins, wurden nach standardisierter Vorgehensweise abgeleitet (Petoukhov *et al.*, 2012). Die SAXS-Kurven von Strep-PlaB und der drei C-terminal verkürzten Varianten wurden mit einer Konzentration von 1 mg/ml aufgenommen. Die Qualität der aufgenommenen Daten wurde manuell überprüft und für weitere SAXS-Modellierungen verwendet. Für Strep-PlaB wurden 20 Modelle mit geringer Auflösung mit dem Programm DAMMIF kalkuliert (Franke & Svergun, 2009). Aus diesen Modellen konnte

mittels der Programme DAMAVER und SUBCOMB ein *ab initio* Modell berechnet werden (Svergun, 1999).

2.2.9 Quervernetzung von gereinigten Proteinen (*Crosslinking*)

Die Quervernetzungsversuche mit Paraformaldehyd (PFA) wurden mit gereinigtem Strep-PlaB aus *E. coli* BL21 (s. 2.2.5) und gereinigtem PlaB-Strep aus *L. pneumophila* *plaB1* (s. 2.2.5) durchgeführt (Klockenbusch & Kast, 2010, Van Itallie *et al.*, 2011, Kiernan, 2000). Für die Quervernetzung wurden jeweils 50 µl 1 mg/ml des gereinigten Proteins eingesetzt. Die Reaktion erfolgte in PBS (pH 7,2) durch Zugabe von Paraformaldehydlösung mit einer Endkonzentration von 0 bis 3% (w/v) für 0 bis 30 min bei Raumtemperatur. Als Negativkontrolle wurde ein Ansatz vor der Zugabe von PFA mit 1% (w/v) SDS versetzt, um die Interaktion zwischen den Proteinen zu stören. Nach Ablauf der Reaktionszeit wurde überschüssiges PFA mit 1 M Glycin in PBS gebunden, sodass die Quervernetzungsreaktion gestoppt wurde. Nach 15-minütiger Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden 15 µl jedes Reaktionsansatzes mittels 7,5% SDS-PAGE und anschließend Western Blot mit dem α -PlaB Antikörper (s. 2.2.6) analysiert.

2.2.10 Nachweis von Phospholipaseaktivität

Zur Untersuchung der Phospholipaseaktivität von PlaB und verschiedener PlaB-Mutanten wurden die bei Seipel und Flieger beschriebenen Methoden (Gewinnung von Zelllysaten und Kulturüberständen, Verdau von Lipidsubstraten, Quantitative Bestimmung freier Fettsäuren (FFA), Lipidextraktion und Dünnschichtchromatographie) angewendet und die in Tabelle 2.7 aufgeführten Substrate eingesetzt (Seipel & Flieger, 2013). Für die Bestimmung der lipolytischen Aktivitäten wurden *Legionella*-Flüssigkulturen, wie unter 2.2.1.2 beschrieben, bis zur spät-exponentiellen Phase kultiviert und *E. coli* BL21 Zellen nach der Expression des gewünschten Proteins geerntet (s. 2.2.1.1 und 2.2.5.1). Gleichmaßen wurden gereinigtes Protein bzw. Fraktionen der Proteinreinigung behandelt und getestet.

Die Detektion der hämolytischen Aktivität wurde in Anlehnung an Bender *et al.* durchgeführt (Bender *et al.*, 2009). Dafür wurden *E. coli* BL21 Kulturen mit 6xHis-PlaB bzw. mit den verkürzten Varianten von 6xHis-PlaB mit PBS auf eine OD₆₆₀ von 0,3 verdünnt. 1 ml dieser Zellen wurde bei 5.000 x g für 5 min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in einem Zwanzigstel des Kulturvolumens in PBS-Puffer mit 10 mg/ml Lysozym in PBS-Puffer resuspendiert und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden im Anschluss mit einer „26-gauge“ Kanüle homogenisiert. Das Zelllysate wurde dann auf das ursprüngliche Kulturvolumen von 1 ml mit PBS ergänzt. In Anlehnung an Kirby *et al.* (Kirby *et al.*, 1998)

wurden 37,5 µl humane Erythrozyten in 10 ml PBS resuspendiert und bei 10.000 x g für 5 min sedimentiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde der Waschvorgang zweimal wiederholt und das Pellet in 10 ml PBS aufgenommen. Im Folgenden wurden 400 µl der Blutsuspension mit dem gleichen Volumen an Zelllysat vermischt und für 2 min bei 16.000 x g zentrifugiert. Nach einer Inkubation bei 37 °C im Brutschrank für 7,5 h wurde die Suspension für 5 sek gevortext und erneut abzentrifugiert. Für die Detektion der Freisetzung des Hämoglobins wurden je 100 µl in einer Mikrotiterplatte bei einer Wellenlänge von 415 nm vermessen. Als Kontrolle wurden 70%iger (v/v) Ethanol und PBS mitgeführt.

2.2.11 Analyse polarer Lipide und Fettsäuren aus *L. pneumophila*

L. pneumophila-Flüssigkulturen vom Corby Wildtyp und der *plaB*-Mutante wurden, wie unter 2.2.1.2 beschrieben, kultiviert, um die polaren Lipide und die Fettsäurezusammensetzung der zwei Stämme in unterschiedlichen Wachstumsphasen zu analysieren. Es wurden je 500 ml aus der exponentiellen Phase (OD₆₆₀ ~0.9 und ~1.5), aus der späten exponentiellen Phase (OD₆₆₀ 1.8-1.9) und aus der stationären Phase (nach 48 und 72 h) entnommen, bei 5.000 x g für 10 min pelletiert und für weitere Analysen bei -80 °C eingefroren. Die Analysen der polaren Lipide und Fettsäuren wurden in Kooperation mit Herrn Dr. B. J.Tindall (Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig) durchgeführt.

2.2.11.1 Analyse polarer Lipide

Zur Extraktion polarer Lipide wurden 100 mg gefrorenes Zellmaterial eingesetzt und in Anlehnung an das Protokoll von Bligh & Dryer (Bligh & Dyer, 1959) in einem Chloroform:Methanol:0,3% NaCl Wasser-Gemisch (1:2:0,8 (v/v/v)) resuspendiert. Nach rührender Inkubation über Nacht wurde das Extraktionsgemisch zentrifugiert, um die Zelltrümmer zu entfernen. Zu dem flüssigen Überstand wurde im Folgenden ein Chloroform:Methanol:0,3% NaCl Wasser-Gemisch im Verhältnis 1:1:0,9 (v/v/v) hinzugegeben. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 3.000 rpm für 5 min trennten sich die Phasen. Die polaren Lipide, welche sich in der Chloroform-Phase ansammelten, konnten nun von den restlichen Bestandteilen separiert und abgenommen werden. Anschließend wurden die polaren Lipide mittels einer zweidimensionalen Dünnschichtchromatographie getrennt. In der ersten Dimension wurde in einem Chloroform:Methanol:Wasser-Gemisch (65:25:4, v/v/v) und in der zweiten Dimension in einem Chloroform:Methanol:Essigsäure:Wasser-Gemisch (80:12:15:4, v/v/v/v) getrennt. Die Detektion der Gesamtheit der Lipide und spezifischer Gruppen erfolgte mittels Dodecamolybdophosphorsäure (gesamte Lipide), Zinzadse Reagenz (Phosphat), Ninhydrin (freie

Aminogruppen), Periodate-Schiff Reagenz (α -Glykole), Dragendorff Reagenz (quaternärer Stickstoff) und α -Naphthol-Schwefelsäure (Glykolipide) (Tindall *et al.*, 2007).

2.2.11.2 Analyse zellulärer Fettsäuren

Zur Isolierung von Fettsäuremethylestern wurden 20 mg gefrorenes Zellmaterial eingesetzt, wobei die Methoden der Verseifung, Methylierung und Extraktion in Anlehnung an die Protokolle von Miller und Kuykendall *et al.* (Miller, 1982, Kuykendall *et al.*, 1988) zur Anwendung kamen. Zur Trennung des Fettsäuremethylestergemisches wurde das *Sherlock Microbial Identification System* (MIS) (MIDI, Microbial ID, Newark, DE 19711 U.S.A.) verwendet, welches aus einem Agilent 6890N Gaschromatographen mit einer 5% Phenyl-Methyl-Silikon Kapillare (0.2 mm x 25 m), einem Flammenionisationsdetektor, einem automatischen Probenentnahmegesät (7683A) und einem HP-Computer mit MIDI Datenbank (Hewlett-Packard Co., Palo Alto, California, U.S.A.) besteht. Die Peaks wurden automatisch integriert und der Name der Fettsäure und deren prozentualer Anteil bestimmt (MIS Standard Software, Microbial ID). Die Parameter des Gaschromatographen wurden wie folgt gewählt: ultrareiner Wasserstoff als Trägergas, 60 kPa Säulenmaximaldruck, 2 μ l Injektionsvolumen, 100:1 Säulentrennverhältnis, Flussrate 5 ml/min; 170 bis 270 °C Säulentemperatur bei 5 °C/min, 240 °C Injektionstemperatur und 300 °C Detektortemperatur.

2.2.12 Proteinase K-Verdau

Legionella-Flüssigkulturen wurden, wie unter 2.2.1.2 beschrieben, bis zur späten exponentiellen Phase kultiviert und 2 ml der frisch gewachsenen Bakterienzellen bei 5.000 x g für 5 min pelletiert. Das Zellpellet wurde einmal mit Tris-Puffer (30 mM Tris pH 8,0, 100 mM NaCl) gewaschen und in 500 μ l Tris-Puffer resuspendiert. Der Proteinase K-Verdau wurde in Anlehnung an Schunder *et al.* sowie Matthews & Roy (Schunder *et al.*, 2010, Matthews & Roy, 2000) durchgeführt. Dazu wurden 100 μ l der gewaschenen Zellen abgenommen (0-Wert), bevor Proteinase K mit einer Endkonzentration von 50 μ g/ml in Tris-Puffer (*plaB*-Mutanten mit *in trans* exprimiertem *plaB* bzw. *plaB*-Varianten) bzw. 30 μ g/ml in Tris-Puffer (Wildtyp- oder Mutantenstämme ohne *in trans* exprimiertem *plaB*) zugesetzt wurde. Der Reaktionsansatz wurde bei 37 °C für 60 min inkubiert. Um den Verdau zu stoppen, wurde jedem Ansatz 8 mM Phenylmethanesulfonylfluorid (PMSF) in 70%igem Isopropanol zugegeben. Nachfolgend wurden 20 μ l jedes Reaktionsansatzes auf den Verbleib von PlaB mittels 12,5% SDS-PAGE und anschließendem α -PlaB Western Blot untersucht. Als Kontrolle wurden ebenfalls MOMP, ein Protein der äußeren Membran, DnaK, ein zytosolisches Protein, und LepB, ein Protein der inneren

Membran, detektiert (Vranckx *et al.*, 2007, Helbig *et al.*, 2007, High *et al.*, 1993, Gosting *et al.*, 1984, De Buck *et al.*, 2008).

Zur Kontrolle der Vitalität der Bakterien wurde sowohl vor als auch nach dem Proteinase K-Verdau eine Lebend/Tod-Färbung mittels des LIVE/DEAD® BacLight Kit (Invitrogen) nach Anweisung des Herstellers durchgeführt und mikroskopisch analysiert.

2.2.13 Fraktionierung Gram-negativer Bakterienzellen

Die zelluläre Fraktionierung membranassoziierter Proteine mittels Triton X-100 wurde in Anlehnung an Roy & Isberg (Roy & Isberg, 1997) durchgeführt. Dazu wurden 100 ml *Legionella*-Flüssigkulturen, wie unter 2.2.1.2 beschrieben, bis zur späten exponentiellen Phase kultiviert und für 10 min bei 6000 x g und 4 °C abzentrifugiert. Die nachfolgenden Schritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Zunächst wurden die Bakterien in 13 ml 50 mM HEPES pH 7,6 resuspendiert und mittels des Emulsi-Flex-C3 Homogenisators (Avestin) in drei Zyklen lysiert. Nicht lysierte Zellen wurden mittels Zentrifugation bei 10.000 x g für 10 min entfernt. Der Überstand (Fraktion L = Lysat), welcher die löslichen und membranassozierten Proteine enthielt, wurde im Folgenden bei 120.000 x g für 60 min ultrazentrifugiert. Der Überstand von diesem Zentrifugationsschritt enthielt die löslichen Proteine des Zytosols und des Periplasmas (Fraktion ÜS). Das Pellet (Fraktion P) wurde in 1 ml mit 2% (v/v) Triton X-100 versetzten 11 mM HEPES pH 7,6 resuspendiert und 1 min im Ultraschallbad behandelt. Anschließend erfolgte ein zweiter Ultrazentrifugationsschritt bei 120.000 x g für 60 min, welcher Proteine der inneren Membran von Proteinen der äußeren Membran trennte. Die Triton-löslichen Proteine wurden abgenommen (Proteine der inneren Membran = IM) und das verbleibende Pellet wurde in 1 ml 50 mM HEPES pH 7,6 (Proteine der äußeren Membran = AM) resuspendiert. Die Fraktionen L und ÜS wurden im Anschluss mittels TCA-Fällung 1:6 aufkonzentriert (s. 2.2.4.1). Für die Detektion von PlaB wurde das gleiche Volumen aller Fraktionen (20 µl IM, AM, L und ÜS) mit Lämmli-Puffer gekocht und mittels 12,5% SDS-PAGE aufgetrennt. Der anschließende Western Blot wurde mit dem präadsorbierten Antiserum gegen PlaB (s. 2.2.6) durchgeführt. Als Kontrolle wurden wieder, wie unter 2.2.12 beschrieben, MOMP, DnaK und LepB detektiert.

2.2.14 Biotinylierung zelloberflächenassoziierter Proteine

Die Biotinylierung membranassoziierter Proteine wurde in Anlehnung an das Protokoll von Hempel *et al.* (Hempel *et al.*, 2010) durchgeführt. Dazu wurden, wie unter 2.2.1.2 beschrieben, 50 ml *Legionella*-Flüssigkulturen bis zur späten exponentiellen Phase kultiviert. Die nachfolgenden Schritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Die frisch gewachsenen Bakterienzellen

wurden bei 5.000 x g für 4 min pelletiert und in 5 ml eiskaltem mit 1 mM PMSF versetzten PBS-Puffer resuspendiert. Sulfo-NHS-SS-biotin (Pierce) wurde zu einer Endkonzentration von 1,6 mg/ml dazugegeben und die Ansätze für 2 h rotierend inkubiert. Die Reaktion wurde mit 100 mM Tris-Puffer pH 8,0 gestoppt. Das überschüssige Biotin wurde durch dreimaliges Waschen der Zellen mit PBS-Puffer entfernt. Nach dem letzten Zentrifugieren bei 6.000 x g für 5 min wurde das Pellet in 4 ml PBS resuspendiert und mittels Ultraschall lysiert. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation bei 10.000 x g für 20 min entfernt. Um die biotinylierten Proteine aus dem Lysat zu isolieren, wurde 400 µl Neutravidin-Agarose (Pierce) zu den 4 ml gegeben. Nach zweistündiger, rotierender Inkubation wurde die Suspension für 1 min bei 500 x g zentrifugiert, um die Agarose zu sedimentieren. Der Überstand mit den nicht gebundenen Proteinen wurde entfernt. Das Pellet wurde viermal mit 1% (v/v) NP-40 versetztem PBS gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Pellet in 400 µl Lämmli-Puffer resuspendiert und für 5 min gekocht. 20 µl der zu analysierenden Fraktionen (Lysat nach der Biotinylierung = L, Agarose/gebundene Fraktion = A) wurde mittels 12,5% SDS-PAGE separiert und anschließend Western Blot gegen PlaB analysiert. Als Kontrolle wurden wieder, wie unter 2.2.12 beschrieben, MOMP, DnaK und LepB detektiert.

3 Ergebnisse

Der zellassoziierten Phospholipase A (PLA) PlaB aus *Legionella pneumophila* wird die bisher stärkste PLA-Aktivität des Bakteriums zugeschrieben. Zudem weist dieses Enzym Lysophospholipase A (LPLA) und hämolytische Eigenschaften auf (Flieger *et al.*, 2004). Für die effiziente Hydrolyse von Phospholipiden mit vorzugsweise langen Fettsäureketten und negativer Nettoladung nutzt PlaB die für Lipasen typische katalytische Triade aus Ser-Asp-His im N-terminalen Bereich des Proteins. Bislang sind nur uncharakterisierte Homologe von *Pseudomonas aeruginosa* und weiteren wasserassoziierten Bakterien bekannt (Bender *et al.*, 2009). Da unter anderem die Funktion des C-terminalen Bereiches bisher noch unbekannt ist, sollte im Rahmen dieser Arbeit das Verständnis und Wissen um das erste beschriebene Mitglied der PlaB-Lipasefamilie erweitert werden.

3.1 Biochemische Analyse der Phospholipase A PlaB

3.1.1 *In silico* Analyse von PlaB

Das aus 474 Aminosäuren bestehende Enzym ist 53,7 kDa groß und weist einen theoretischen isoelektrischen Punkt im basischen Bereich ($pI = 8.38$) auf (ProtParam). Abgesehen von dem katalytischen Zentrum im N-terminalen Bereich des Proteins, welches die Aminosäuren Ser₈₅, Asp₂₀₃ und His₂₅₁ umfasst (Bender *et al.*, 2009), besitzt PlaB keine weiteren bekannten konservierten Domänen bzw. Sequenzbereiche (s. Abb. 3.1). Dies schließt den C-terminalen Bereich, welcher sich über etwa 170 Aminosäuren erstreckt und keine signifikanten Homologien zu bekannten und charakterisierten Proteinen aufweist, mit ein. Gleichmaßen konnten mit dem Proteinstruktur-Vorhersageprogramm Phyre2 nur Strukturhomologe gefunden werden, deren Aminosäuresequenzen nicht den C-terminalen Bereich abdeckten.

Des Weiteren gibt es keine direkten Hinweise auf Transmembranhelices zur Membranverankerung (HMMTOP, TMHMM, PSORT, TMPred) oder auf ein putatives Signalpeptid zum Transport über die innere Membran des Proteins (SignalP, Phobius, TatP 1.0, PrediSi). Vorangegangene Studien zur Lokalisation deuten allerdings darauf hin, dass aktives PlaB mit der äußeren Membran des Bakteriums assoziiert ist (Schunder *et al.*, 2010). Diese Annahme stimmt mit der Vorhersage des Programmes PSLpred überein, welches basierend auf der Aminosäurezusammensetzung und den physikochemischen Eigenschaften für PlaB eine Lokalisation der äußeren Membran vorhersagt. Es gibt jedoch noch keine Hinweise darauf, in welcher Art und Weise die Assoziation an der äußeren Membran erfolgt. Das Vorhersageprogramm PrePS schließt eine Prenylierung aufgrund fehlender Sequenzmotive (C-terminales CaaX Motiv, C-terminales Cystein) für Farnesylierung bzw. Geranylgeranylierung aus. Zudem ist PlaB laut LipoP kein Lipoprotein, was mittels Lipidresten in der Membran verankert

wird. Dieses Programm diskriminiert zwischen Lipoprotein-Signalpeptiden, anderen Signalpeptiden und N-terminalen Membranhelices in Gram-negativen Bakterien und kann somit Lipoproteine basierend auf der Aminosäuresequenz vorhersagen. Des Weiteren sprechen Analysen zur Hydrophobizität gegen eine integrale Verankerung. Allerdings wird dem Bereich zwischen Aminosäure 282 und 310 eine *coiled-coil* Region zugewiesen (COILS, Predictors), was zu einer Dimerisierung des Proteins beitragen kann (s. Abb. 3.1). Ob PlaB zur Oligomerisierung neigt, wie es bezüglich der *Escherichia coli* outer membrane phospholipase A OMPLA gezeigt wurde (Snijder & Dijkstra, 2000), ist bisher noch nicht bekannt. Jedoch deuten Analysen mittels des Vorhersageprogramms für Quartärstrukturen *mericity* auf eine Dimerisierung von PlaB hin. Dieses Programm kann zwischen der primären Aminosäuresequenz von Homodimeren und nicht-Homodimeren diskriminieren (Garian, 2001).

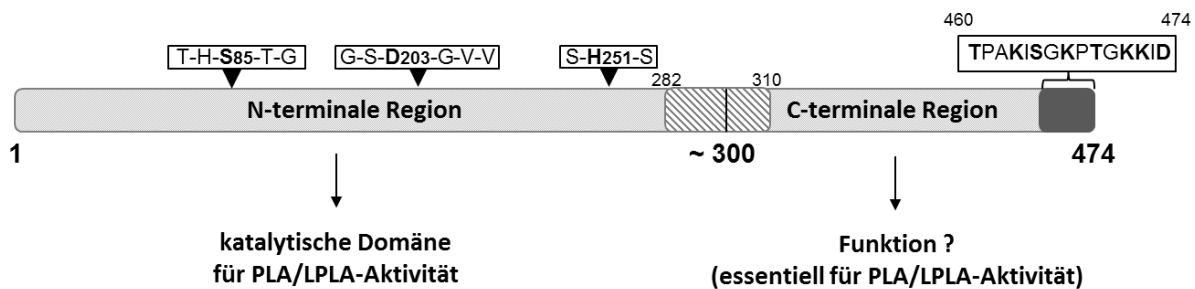


Abb. 3.1: Schematische Darstellung von PlaB mit bekannten Regionen und Bereichen. Übersicht über die N-terminale (Aminosäure 1 bis ~300) und C-terminale (Aminosäure ~300 bis 474) Region und die letzten 15 Aminosäuren (dunkelgrau) von PlaB. Im N-terminalen Bereich liegt das aktive Zentrum mit der bekannten katalytischen Triade Ser₈₅-Asp₂₀₃-His₂₅₁. Zwischen Aminosäure 282 und 310 ist eine putative *coiled-coil* Region (gestreifte Fläche) vorhergesagt (COILS, Predictors). Die Zahlen geben die Positionen der Aminosäuren an.

3.1.2 Untersuchungen zur enzymatischen Aktivität verschiedener PlaB-Mutanten

Zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität von PlaB wird die Menge an freigesetzten Fettsäuren (FFA) aus den bevorzugten Substraten bestimmt. Aus vorangegangenen Studien ist bekannt, dass sowohl Phospholipide, wie Phosphatidylglyzerol (PG) und -cholin (PC), als auch Lysophospholipide, wie Lysophosphatidylglyzerol (LPG) und -cholin (LPC), von PlaB hydrolysiert werden. Mittels Basenpaarsubstitution (*site-directed mutagenesis*, ortsspezifische Mutagenese) wurden für die PLA-Aktivität und die LPLA-Aktivität relevante Aminosäuren im N-terminalen Bereich des PlaB-Proteins entdeckt. Neben der katalytischen Triade spielen His₇, Thr₈₃, Ser₁₂₉ und His₂₇₀ eine wichtige Rolle für die Substratspezifität und somit auch für die Enzymaktivität (Bender *et al.*, 2009). Der C-terminalen Extension von etwa 170 Aminosäuren konnte bisher noch keine Funktion zugeordnet werden.

3.1.2.1 Bedeutung des C-Terminus für die enzymatische Aktivität von PlaB

In Vorarbeiten wurde bereits gezeigt, dass bei C-terminal verkürzten PlaB-Varianten von 15 bis 167 Aminosäuren keine enzymatische Aktivität mehr nachweisbar war (Bender *et al.*, 2009). Um die Rolle der C-terminalen Region (Aminosäuren 303-474) in Bezug auf die enzymatische Aktivität zu analysieren, wurde in dieser Arbeit zunächst der N-terminale Bereich (Aminosäuren 1-302) und der C-terminale Bereich (Aminosäuren 303-474) des PlaB-Proteins getrennt mit jeweils einer N-terminalen 6xHis-Fusion in *E. coli* BL21 rekombinant exprimiert. Im Anschluss wurden die Zelllysate auf phospholipolytische Aktivität getestet. Die Expression der Fusionsproteine wurde mittels SDS-PAGE überprüft. Sowohl der N-terminale als auch der C-terminale Bereich von PlaB zeigten keinerlei Aktivität (Abb. 3.2). Daher wurde der Aktivitätstest mit den zusammen inkubierten Zelllysaten wiederholt. Wie aus Abbildung 3.2 ersichtlich wird, sind sowohl die PLA- als auch die LPLA-Aktivitäten der gemeinsam inkubierten Proteinregionen von PlaB mit dem *E. coli* BL21 Lysat und den nicht induzierten, plasmidtragenden *E. coli* BL21 Lysaten vergleichbar. Somit konnte durch das Zusammenführen der N-terminalen Region, welche das katalytische Zentrum enthält, mit der C-terminalen Region die Aktivität nicht wiederhergestellt werden.

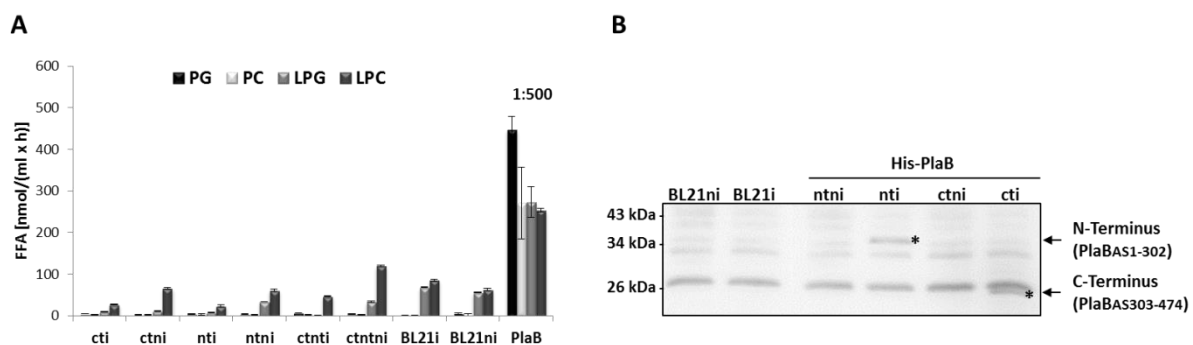


Abb. 3.2: Lipidhydrolyse des getrennt exprimierten N- und C-terminalen Bereiches von PlaB. *E. coli* BL21 Zelllysate mit dem exprimierten 6xHis-fusionierten N- (nt) bzw. C-terminalen (ct) Bereich von PlaB (pKK3, pKK2) wurden zusammen inkubiert und auf enzymatische Aktivität überprüft. Als Kontrollen wurden die nicht IPTG-induzierten (ni) plasmidtragenden *E. coli* BL21 Lysate, induziertes (i) bzw. nicht induziertes (ni) *E. coli* BL21 Lysat und *E. coli* DH5a Zelllysate mit konstitutiv exprimiertem *plaB* mitgeführt. **A)** Die *E. coli* BL21 Zelllysate wurden unverdünnt und das DH5a Zelllysate 1:500 verdünnt mit verschiedenen Phospholipiden (s. Tab. 2.7) bei 37 °C für 4 h inkubiert und die Freisetzung der freien Fettsäuren (FFA) bestimmt. **B)** Die Expression des N- und C-terminalen Bereiches von PlaB wurde mittels α -His Western Blot überprüft. Die Daten sind repräsentativ für Dreifachwerte von drei unabhängigen Experimenten.

Schon das Fehlen der letzten 15 Aminosäuren eliminiert die Aktivität von PlaB (Bender *et al.*, 2009). Um für die enzymatische Aktivität wichtige Aminosäuren innerhalb der letzten 15 Aminosäuren einzugrenzen, wurden im Folgenden zwei weitere C-terminal verkürzte Varianten von PlaB generiert. Sowohl das Wildtypprotein und die schon bekannte um 15 Aminosäuren

verkürzte Variante (PlaB_{aa1-459}), als auch die neuen um 5 (PlaB_{aa1-469}) bzw. 10 Aminosäuren (PlaB_{aa1-464}) verkürzten Konstrukte wurden mit einer N-terminalen 6xHis-Fusion in *E. coli* BL21 zur Expression gebracht. Die anschließende Bestimmung der phospholipolytischen Aktivität der Zellysate zeigte, dass schon das Fehlen von 5 Aminosäuren (His-PlaB_{aa1-469}) die PC-abhängige PLA-Aktivität um 90% und die PG-abhängige PLA-Aktivität um 25% im Vergleich zum Wildtypprotein reduzierte (Abb. 3.3 A). Das Entfernen 5 weiterer Aminosäuren (His-PlaB_{aa1-464}) verursachte einen Verlust der PC-abhängigen PLA-Aktivität aber auch der LPC-abhängigen LPLA-Aktivität und eine Reduktion der PG-Aktivität um weitere 55%. Die LPG-abhängige LPLA-Aktivität wurde um 85% reduziert im Vergleich zu His-PlaB. Wie schon zu erwarten war, zeigte die verkürzte Variante um 15 Aminosäuren (His-PlaB_{aa1-459}) keinerlei Aktivitäten mehr (Abb. 3.3 A). Neben der phospholipolytischen Aktivität wurde ebenfalls das hämolytische Potential der drei verkürzten Varianten getestet. Wie in Abbildung 3.3 B ersichtlich, reduzierte sich die hämolytische Aktivität mit zunehmender C-terminaler Trunkierung von PlaB. Das Expressionslevel der verkürzten Varianten ist vergleichbar mit dem Vollängenprotein (Abb. 3.3 C). Um einen Einfluss der N-terminalen His-Fusion auf die enzymatische Aktivität ausschließen zu können und eine Isolierung der verkürzten Varianten zu ermöglichen, wurden sowohl die drei verkürzten Varianten als auch das Vollängenprotein mit einer N-terminalen Strep-Fusion in *E. coli* BL21 exprimiert sowie gereinigt (s. 3.1.2.3) und auf phospholipolytische Aktivitäten hin untersucht. Die gereinigten Strep-Proteine zeigten ein vergleichbares Verhalten bezüglich ihrer PLA/LPLA-Aktivitäten (Abb. 3.3 D). Das Fehlen von 5 Aminosäuren (Strep-PlaB_{aa1-469}) führte hierbei zu einer 60%igen Reduktion der PC-abhängigen PLA-Aktivität, während die PG-abhängige PLA-Aktivität erhalten blieb. Bei einer Verkürzung um 10 Aminosäuren (Strep-PlaB_{aa1-464}) reduzierte sich die PG-abhängige PLA-Aktivität des gereinigten Proteins um 26% und die PC-abhängige PLA-Aktivität um 100%. Das Fehlen der letzten 15 Aminosäuren (Strep-PlaB_{aa1-459}) führte ebenfalls zum Verlust der PLA- und LPLA-Aktivitäten. Neben einer geringen PG-abhängigen PLA-Restaktivität von etwa 8%, konnte keine PLA/LPLA-Aktivität bei der um 15 Aminosäuren verkürzten Variante detektiert werden (Abb. 3.3 D). Um Veränderungen in der Sekundärstruktur der Proteine auszuschließen, welche durch fehlende Aminosäuren hervorgerufen werden können, wurden CD-spektroskopische Analysen der vier gereinigten Strep-Proteine durchgeführt. Ein Vergleich der Sekundärstrukturen der vier Strep-Proteine zeigte, dass die drei verkürzten PlaB-Varianten keine großen Veränderungen in der Sekundärstruktur aufwiesen im Vergleich zu Strep-PlaB (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend bestätigten diese Untersuchungen die Wichtigkeit der letzten 15 Aminosäuren für die enzymatische Aktivität von PlaB.

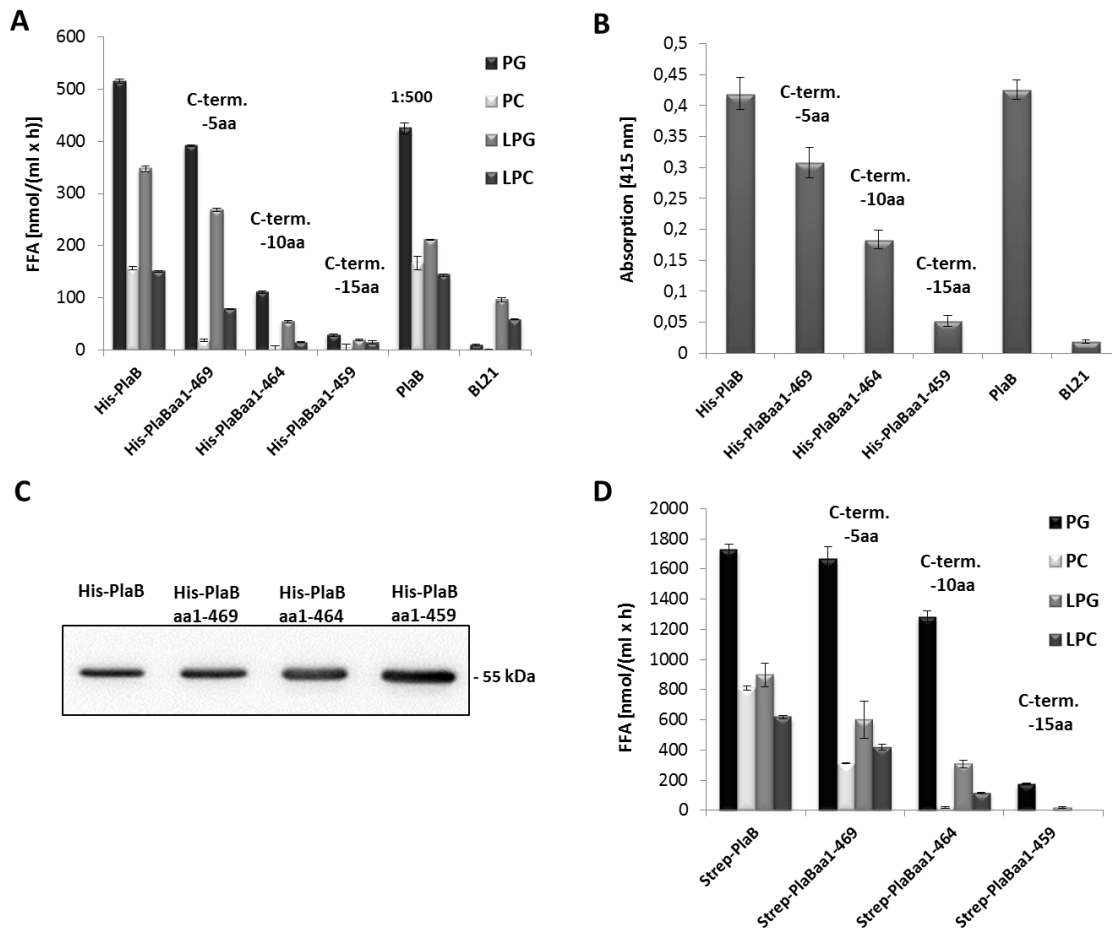


Abb. 3.3: Die letzten 15 Aminosäuren sind essentiell für die enzymatische Aktivität von PlaB. *E. coli* BL21 Zelllysate mit dem exprimierten 6xHis-PlaB (pJB03) und den C-terminal verkürzten Varianten von His-PlaB (pKK5, pKK6, pKK8) sowie dem gereinigten Strep-PlaB (pKK19) und die dazugehörigen C-terminal verkürzten Varianten (pKK25-27) wurden auf enzymatische Aktivität überprüft. **A)** Die Zelllysate wurden mit den Phospholipiden (s. Tab. 2.17 und Text) bei 37 °C für 2 h inkubiert und die Freisetzung der freien Fettsäuren (FFA) bestimmt. Als Kontrolle wurde *E. coli* BL21 Zelllysate und 1:500 verdünntes DH5 α (pJB04) Zelllysate mit konstitutiv exprimiertem *plaB* mitgeführt. **B)** Für die kontaktabhängige Hämolyse wurden die Zelllysate mit humanen Erythrozyten inkubiert. Nach 7,5 h bei 37 °C wurde die Absorption bei 415 nm gemessen. **C)** Die Expression der verwendeten 6xHis-fusionierten Konstrukte wurde mittels α -His Western Blot überprüft. **D)** Die Freisetzung der FFA wurde ebenfalls nach 45-minütiger Inkubation von 0,04 ng/ μ l gereinigtem Strep-PlaB bzw. der C-terminal verkürzten Varianten von Strep-PlaB mit den Phospholipiden überprüft. Die Daten sind repräsentativ für Dreifachwerte von drei (A, C, D) bzw. zwei (B) unabhängigen Experimenten.

Zur weiteren Charakterisierung des C-terminalen Bereiches von PlaB wurde eine Alanin-Mutagenese innerhalb der letzten 15 Aminosäuren durchgeführt. Diese sollte Aufschluss über die Wichtigkeit der Aminosäuren mit polaren Seitenketten für die phospholipolytische Aktivität geben. Dazu wurden acht Aminosäuren (2x Thr, 4x Lys, 1x Ser, 1x Asp) gegen Ala ausgetauscht. Da die Substitution von Prolin zu strukturellen Veränderungen des Proteins führen kann, wurde diese Aminosäure nicht in den Alaninscan mit einbezogen. Ebenso wurden Aminosäuren mit hydrophoben Seitenketten (2xIle, 2xGly) nicht gegen das hydrophobe Ala ausgetauscht. Die Gruppe um R. J. Ward zeigte in diesem Zusammenhang, dass die positiv geladenen Aminosäuren innerhalb der C-terminalen Region der PLA₂ des *Bothrops jararacussu* Giftes die

Membranpermeabilisierung beeinflussen und somit auch die Enzymaktivität unterstützen (Chioato *et al.*, 2007). Des Weiteren ist bekannt, dass die C-terminale Extension der Klasse II sekretierter eukaryotischer PLA₂, welche viele geladene Aminosäurereste enthält, unter anderem an der Substratbindung und der enzymatischen Katalyse mit beteiligt ist (Scott & Sigler, 1994).

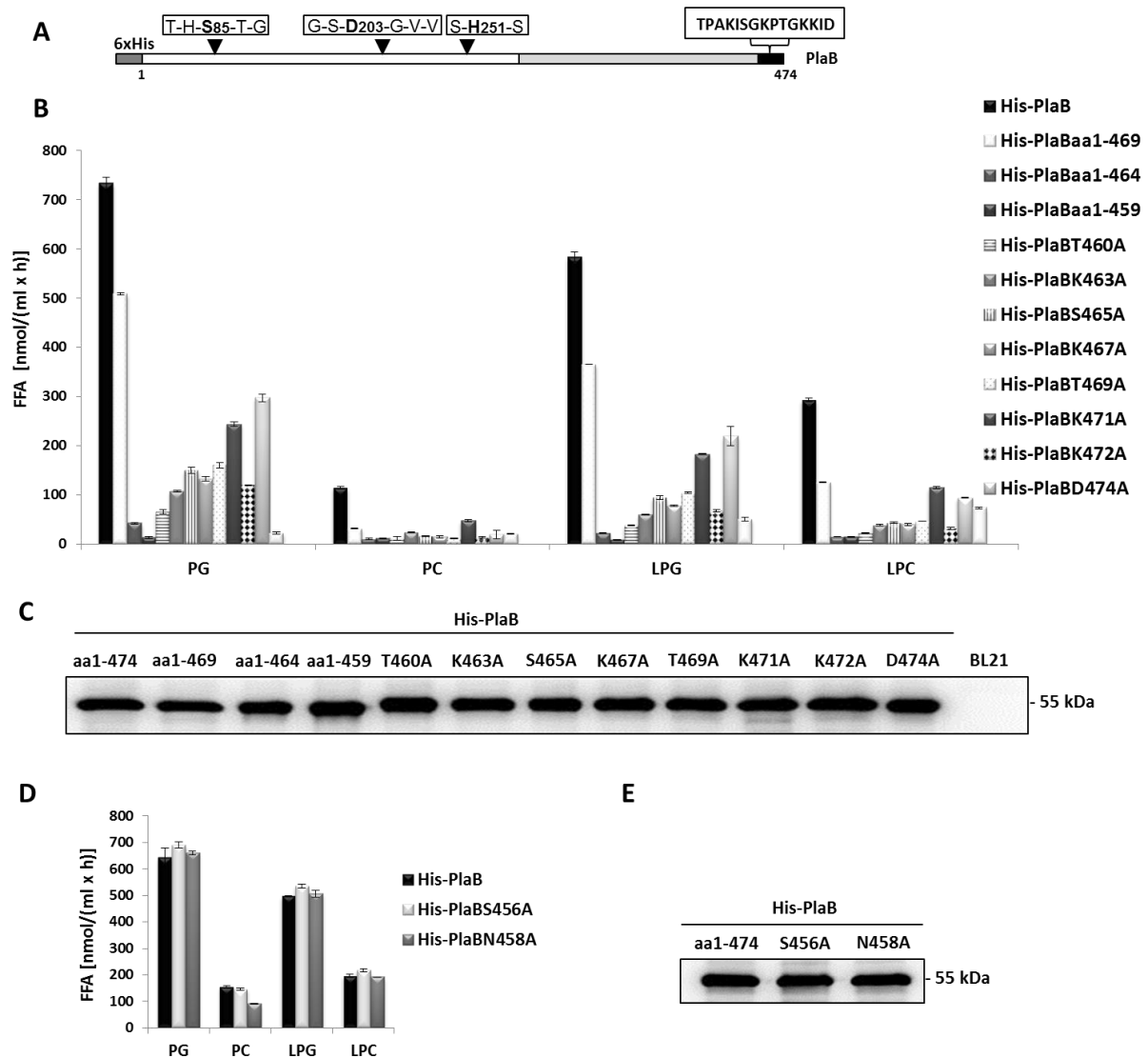


Abb. 3.4: Lipidhydrolyse der Alanin-Mutagenese-Mutanten von His-PlaB. **A)** Übersicht über die N-terminale (Aminosäure 1 bis ~300; weiß) und C-terminale (Aminosäure ~300 bis 474, grau) Region und die letzten 15 Aminosäuren (schwarz) von PlaB. Acht polare Aminosäuren innerhalb der letzten 15 Aminosäuren sind essentiell für die enzymatische Aktivität. **B)** *E. coli* BL21 Zelllysate mit den 6xHis-fusionierten Alaninmutanten (pKK9-16), den drei C-terminal verkürzten Varianten (pKK5, pKK6, pKK8) und 6xHis-PlaB (pJB03) wurden für 2 h bei 37 °C mit den Phospholipiden aus Tabelle 2.17 inkubiert und die Menge an freigesetzten Fettsäuren (FFA) bestimmt. Als Kontrolle wurde *E. coli* BL21 Zelllysate mitgeführt. **C, E)** Die Expression der verwendeten His-fusionierten Konstrukte wurde mittels α -PlaB Western Blot überprüft (s. 3.1.3.4). **D)** *E. coli* BL21 Zelllysate mit den zwei 6xHis-fusionierten Alaninmutanten (pKK56, pKK57) außerhalb der letzten 15 Aminosäuren und 6xHis-PlaB (pJB03) wurden für 2 h bei 37 °C mit den Phospholipiden aus Tabelle 2.17 inkubiert und die Menge an FFA bestimmt. Die Daten sind repräsentativ für Dreifachwerte (B, D) von drei (B, C) bzw. zwei (D, E) unabhängigen Experimenten.

Die Mutanten wurden mit einer N-terminalen 6xHis-Fusion in *E. coli* BL21 exprimiert und die Zelllysate auf phospholipolytische Aktivität getestet. Interessanterweise reduzierte sich die enzymatische Aktivität jeder Mutante um wenigstens 50% im Vergleich zum Wildtypprotein (Abb. 3.4). Dabei ist das Expressionslevel der mutierten Proteine zu PlaB vergleichbar (Abb. 3.4 C). Zum Vergleich wurden zusätzlich zwei polare Aminosäuren außerhalb der letzten 15 mutiert (Ser₄₅₆, Asn₄₅₈) und die Aktivitäten der Zelllysate überprüft. Es zeigte sich im Allgemeinen kein negativer Effekt auf die PLA/LPLA-Aktivitäten (Abb. 3.4 D), was die Wichtigkeit der polaren Aminosäuren innerhalb der letzten 15 Aminosäuren für die enzymatische Aktivität unterstreicht. Lediglich die PC-abhängige PLA-Aktivität bezüglich der His-PlaB_{N458A}-Mutante zeigte eine Reduktion um 48% verglichen zum Wildtyp (Abb. 3.4 D).

3.1.2.2 Identifizierung weiterer relevanter Aminosäuren für die enzymatische Aktivität von PlaB

Die in Abschnitt 3.1.2.1 angewandte ortsspezifische Mutagenese (Alanin-Mutagenese) konnte für die Enzymaktivität essentielle Aminosäuren innerhalb der letzten 15 Aminosäuren ausmachen. Um noch weitere wichtige Aminosäuren, besonders in der gesamten C-terminalen Region, zu identifizieren, wurde im Folgenden die zufällige Mutagenese mittels *error-prone* PCR durchgeführt. Das über die Zufallsmutagenese veränderte pJB04-Plasmid mit integriertem *plaB*-Gen wurde in *E. coli* DH5 α Zellen transformiert. Wie bereits aus früheren Studien hervorging, besitzt PlaB hämolytisches Potential, das mit der PC-abhängigen PLA-Aktivität korreliert (Bender *et al.*, 2009, Flieger *et al.*, 2004). Diese Eigenschaft wurde für das Auffinden katalytisch inaktiver Mutanten genutzt.

Die erhaltenen 907 Transformanten wurden somit auf einen Defekt in der hämolytischen Aktivität hin mittels Humanblut-Agarplatten untersucht (Abb 3.5 A.). Da *plaB* bzw. die mutierten Varianten konstitutiv in *E. coli* exprimiert wurden, ließen sich die nicht aktiven Enzymvarianten anhand des fehlenden Hämolysehofes identifizieren. Bei 110 der insgesamt 907 *E. coli* Klone zeigte sich nach zweitägiger Kultivierung bei 37 °C kein Hämolysehof im Vergleich zum Wildtyp (*E. coli* [pJB04]) (s. Abb. 3.5 B). Davon enthielten 76 das *plaB*-Gen, welches mittels Kolonie-PCR nachgewiesen wurde. Die *plaB*-Insertion im pJB04-Plasmid dieser 76 Klone wurde daraufhin sequenziert, um die spezifische Mutation im *plaB*-Gen und somit die veränderte Aminosäure in der Proteinsequenz zu identifizieren. Bei der Analyse der Sequenzen wurden 29 Klone mit nur einer *missense* Punktmutation gefunden (s. Tab. 3.1). Die übrigen Klone enthielten entweder mehr als eine Punktmutation, wodurch die die Aktivität beeinflussende Aminosäure nicht eindeutig identifiziert werden konnte, oder eine Basen-Deletion, was zur Veränderung der nachfolgenden Aminosäuresequenz führte.

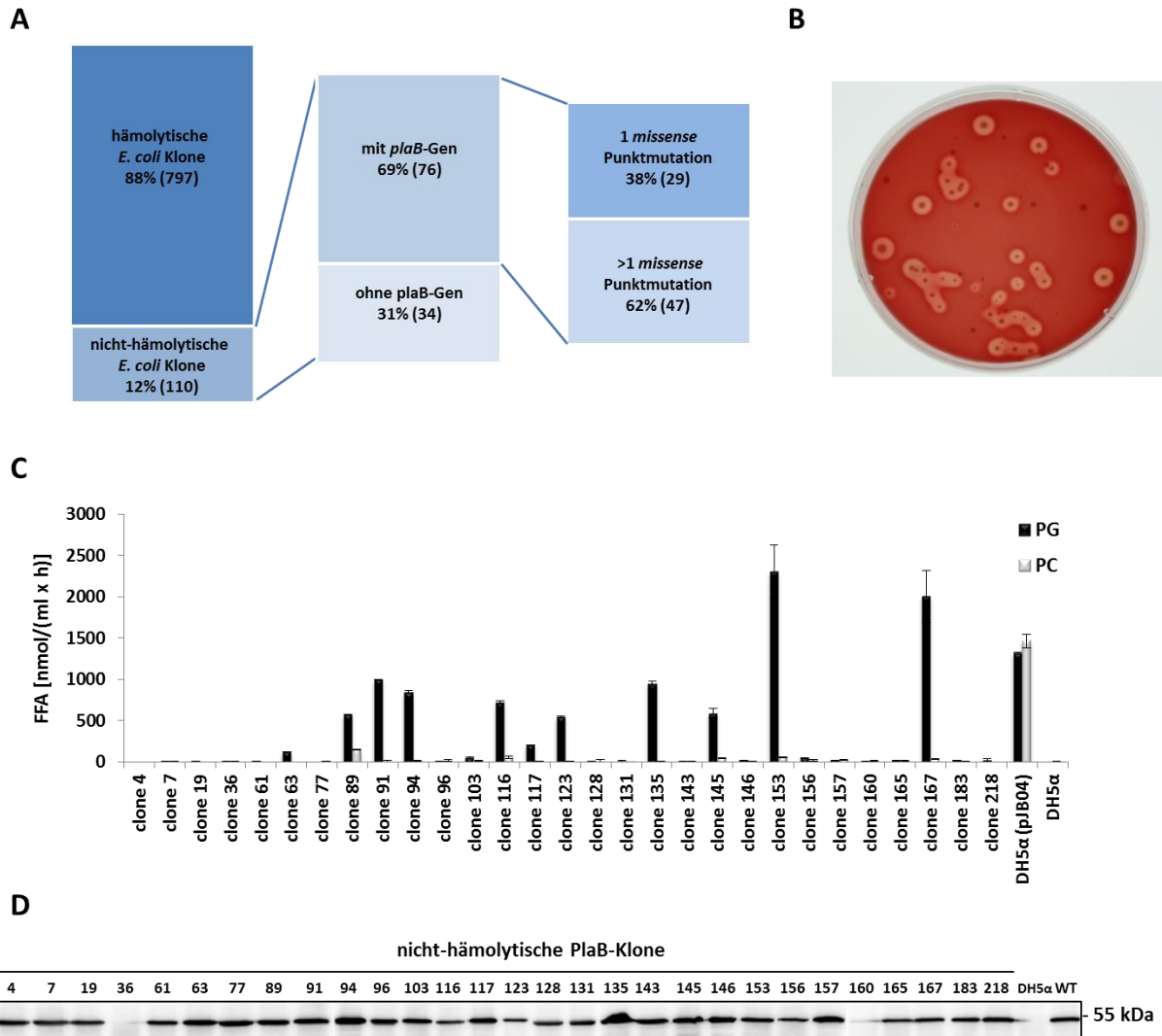


Abb. 3.5: Zufallsmutagenese mittels *error-prone* PCR zeigte Mutanten mit reduzierter enzymatischer Aktivität von PlaB. **A)** Nach der Transformation von DH5α mit dem mutagenisierten pJB04-Plasmid wurden 907 Kolonien erhalten. Das Diagramm fasst die Ergebnisse des Screenings auf nicht-hämolytische *E. coli* DH5α Klone mittels Humanblut-Agarplatten zusammen. Eine anschließende Kolonie-PCR identifizierte 110 Klone mit dem *plaB*-Gen. **B)** Exemplarische Humanblut-Agarplatte mit Klonen ohne und mit Hämolysehof. **C)** DH5α Zelllysate der 29 nicht-hämolytischen Klone wurden für 1 h bei 37 °C mit den Phospholipiden PG und PC inkubiert. Die Bestimmung der freigesetzten Fettsäuren (FFA) spiegelte die phospholipolytische Aktivität wider. **D)** Für die 29 nicht-hämolytischen Klone wurde die Expression des PlaB-Proteins mittels α-PlaB Western Blot überprüft. Als Kontrollen wurde DH5α ohne und mit pJB04-Plasmid (Wildtyp, WT) mitgeführt. Die Daten sind repräsentativ für Dreifachwerte von drei unabhängigen Experimenten (C, D).

Neben dem schon bekannten Asp₂₀₃ aus der katalytischen Triade wurden 23 weitere Aminosäuren entdeckt, welche die PLA-Aktivität beeinflussen. Da die PC-abhängige PLA-Aktivität mit dem hämolytischen Potential einhergeht (Bender *et al.*, 2009), war es zu erwarten, dass alle 29 Klone keine PC-abhängige PLA-Aktivität aufwiesen. Dies konnte experimentell bestätigt werden (Abb. 3.5 C). Bei 11 der 29 Klone konnte allerdings PG-abhängige PLA-Aktivität detektiert werden. Western Blot Analysen mit dem α-PlaB Antikörper (s. 3.1.3.4) bestätigten, dass bei 28 Klonen das Gen exprimiert wurde und somit das Fehlen der enzymatischen Aktivität bei den restlichen 17

Klonen nicht durch Ausbleiben der Expression zu erklären wäre (Abb. 3.5 D). Nur bei einem Klon (Klon 36) konnte im Western Blot keine Bande in Höhe von 54 kDa detektiert werden. Bezüglich des Klons 160 ist nur eine sehr schwache Bande zu erkennen. Um auszuschließen, dass die geringe PlaB-Menge dieses Klons zum Aktivitätsverlust führte, wurde von diesem Klon eine weitere Aktivitätsuntersuchung verbunden mit einer Western Blot Analyse durchgeführt. Diesmal wurde zum Vergleich die Proteinmenge von Klon 160 dem Wildtyp angepasst und es konnte auch hier wieder keine Aktivität im Vergleich zum Wildtyp detektiert werden.

Tab. 3.1: Übersicht über Mutanten der Zufallsmutagenese mit einer *missense* Punktmutation

Klon	Punktmutation	Lokalisation innerhalb des Proteins	PG-PLA Aktivität	Expression von PlaB	Konservierung innerhalb der PlaB-Homologen
123	Val ₆ Asp	N-Terminus	+	+	+
157,218	Trp ₉ Arg		-	+	++
36	Val ₃₇ Ala		-	-	-
94	Ser ₄₇ Cys		++	+	++
135	Asp ₅₀ Gly		++	+	++
165	Cys ₈₁ Arg		-	+	-
89	Pro ₁₀₇ Leu		+	+	++
77, 143	Met ₁₁₃ Val		-	+	++
128, 131	Met ₁₁₃ Ile		-	+	++
156	Gly ₁₄₄ Arg		-	+	++
63	Glu ₁₅₂ Lys		+	+	-
153, 167	Asn ₁₉₄ Asp		++	+	-
61	Asp₂₀₃Asn		-	+	++
4	Asn ₂₁₂ Asp		-	+	++
183	Leu ₂₁₈ Ser		-	+	+
96	Leu ₂₈₀ Gln		-	+	-
91	Glu ₃₀₆ Lys	C-Terminus	++	+	-
160	Ser ₃₂₆ Pro		-	+	-
7	Leu ₃₃₂ Phe		-	+	-
146	Asp ₃₃₄ Gly		-	+	++
116	Asp ₃₄₂ Gly		++	+	++
145	Asp ₃₆₅ Gly		+	+	+
117	Asp ₃₈₁ Gly		+	+	+
103	Ala ₄₀₄ Thr		-	+	-
19	Met ₄₃₉ Val		-	+	-

PG-Aktivität: + = < 50%, ++ = >50%, - = 0% im Vergleich zum Wildtyp; Expression: + = ja, - = nein; Homologie: + = ähnliche Aminosäure, ++ = gleiche Aminosäure, - = keine Homologie (ClustalW)

Beim Betrachten der homologen Proteinsequenzen von PlaB in anderen Bakterien (Bender *et al.*, 2009) wird ersichtlich, dass 13 der 22 neu gefundenen Aminosäuren innerhalb dieser noch uncharakterisierten Proteine hoch konserviert sind (s. Anhang).

Zusammenfassend führte die zufällige Mutagenese des *plaB*-Gens zu 23 für die PC-PLA und zum Teil auch für die PG-PLA Aktivität essentiellen Aminosäuren, die über die gesamte Proteinsequenz verteilt sind. Neun Aminosäuren sind innerhalb der C-terminalen Region zu finden.

3.1.3 Strategien zur Expression und Reinigung von PlaB

Bisher war es nicht möglich gewesen, PlaB mittels verschiedener Expressions- und Reinigungsstrategien in reiner und löslicher Form zu erhalten. Die bisher getesteten Fusionsproteine (z.B. mit GST und 6xHis) und ebenso die Tag-freie Variante in Verbindung mit verschiedenen Expressionsbedingungen (Temperatur, Induktorkonzentration, Expressionszeit) und Expressionsorganismen (*E. coli* BL21, *Pichia pastoris*, *L. pneumophila*) sowie unterschiedlichen Reinigungsverfahren (Affinitätschromatographie, Ionenaustauscher, Solubilisierung präzipitierter Proteine) führten nicht zum Erfolg (Bender, 2009*). Jedoch ist es von zentraler Bedeutung, PlaB als Protein in Reinform für die bessere Charakterisierung biochemischer und struktureller Eigenschaften, aber auch zur Generierung eines funktionellen PlaB-spezifischen Antikörpers, zu gewinnen.

3.1.3.1 Koexpression von GST-fusioniertem PlaB mit Chaperonen

Die N-terminale Fusion von PlaB mit Glutathion-S-transferase (GST, 28 kDa) aus *Schistosoma japonicum* führte in der Vergangenheit zwar zur Expression ausreichender Mengen des Fusionsproteins in *E. coli* BL21, jedoch zeigte sich, dass GST-PlaB nur in Form von unlöslichen Aggregaten (*inclusion bodies*) vorlag (Bender, 2009*). Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit die Koexpression von GST-fusioniertem PlaB mit Chaperonen getestet. Chaperone sind Proteine, die neu synthetisierte Proteine bei ihrer korrekten Faltung unterstützen und somit die Löslichkeit bzw. die Produktion der aktiven Form des überexprimierten Proteins fördern (Thomas *et al.*, 1997, Wall & Plückthun, 1995). Zu diesem Zweck wurde *plaB* in pGEX-6P-1 kloniert und zusammen mit dem pG-KJE8-Plasmid (Chaperon-Expressionsplasmid) in *E. coli* BL21 transformiert. In Tabelle 2.28 (s. 2.2.5.1) sind die getesteten Expressionsbedingungen (IPTG Konzentration, Expressionszeit und -temperatur) aufgeführt. GST-PlaB wurde entweder mit den Chaperonen GroEL-GroES oder mit DnaK-DnaJ-GrpE, aber auch mit allen aufgeführten Chaperonen gemeinsam koexprimiert. Die Induktion mit Arabinose, Tetrazyklin bzw. IPTG führte zur gewünschten Expression von DnaK-DnaJ-GrpE, GroEL-GroES bzw. GST-PlaB bei 37 °C (Abb.

3.6). Aufgrund des zu kleinen Molekulargewichtes (MG) von 11 kDa der kleinen Untereinheit (GroES) des GroEL-GroES Chaperonkomplexes, tritt die entsprechende Bande im Coomassie-Gel nicht auf (Abb. 3.6 A). Um den Anteil an löslichem GST-PlaB zu ermitteln, wurden die pelletierten Bakterienzellen mittels BugBuster, einem Fertigreagenz zum Aufschluss von Bakterienzellen und zur Extraktion von Proteinen, aufgeschlossen. Die anschließende Zentrifugation der Lysate trennte die löslichen (Überstand) von den unlöslichen Proteinen (Sediment). Die Analyse der Fraktionen mittels α -GST Western Blot zeigte eine starke GST-PlaB Bande allerdings nur im unlöslichen Sediment. Im löslichen Überstand wurde nur eine sehr schwache GST-PlaB Bande in Kombination mit GroEL-GroES detektiert (Abb. 3.6 B). Um die Ausbeute an löslichem Protein zu steigern, wurde die Koexpression von GST-PlaB mit GroEL-GroES auch bei niedrigeren Expressionstemperaturen (27 °C und 18 °C) durchgeführt. Zudem wurden zwei weitere IPTG Konzentrationen (0,1 und 0,3 mM) zur Induktion der Expression von GST-PlaB getestet. Die aufgeführten Expressionsbedingungen (s. auch Tab. 2.28) führten ebenfalls nicht zu einer Erhöhung des löslichen Anteils an GST-PlaB (Daten nicht gezeigt). Da die Koexpression von GST-PlaB zusammen mit den eingesetzten Chaperonen bei verschiedenen Expressionsbedingungen nicht zu einer deutlichen Verbesserung der Löslichkeit des rekombinanten Fusionsproteins führte, wurde im Folgenden eine Fusion mit dem Maltose-Bindeprotein (MBP) getestet.

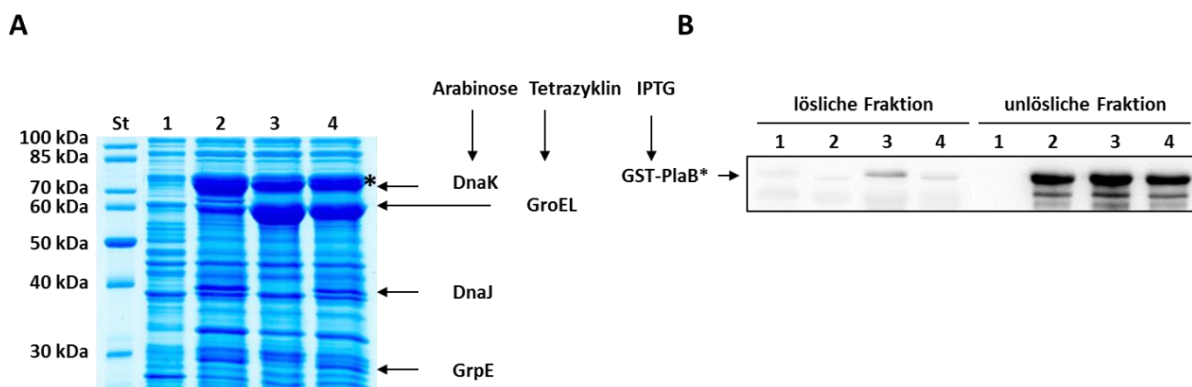


Abb. 3.6: Koexpression von GST-PlaB mit den zwei Chaperonkomplexen DnaK-DnaJ-GrpE und GroEL-GroES bei 37 °C für 3 h. Für die Testexpression wurden *E. coli* BL21(pG-KJE8) mit Arabinose zur Expression des Chaperonkomplexes DnaK-DnaJ-GrpE und/oder mit Tetracyklin zur Expression des Chaperonkomplexes GroEL-GroES induziert. Für die Koexpression wurde ebenfalls mit 1 mM IPTG zur Expression von GST-PlaB (pKK1) induziert. Die reduzierende SDS-PAGE der *E. coli* BL21 Zelllysate mit anschließender Coomassie-Färbung (A) diente der Überprüfung der Expression aller induzierten Proteine. Mittels α -GST Western Blot (B) wurde die Menge an GST-PlaB in den löslichen und unlöslichen Fraktionen detektiert. Es wurden 10 μ l der entsprechenden Zelllysate für die Analysen verwendet. Spuren: 1 = nicht induziertes *E. coli* BL21 Zelllysate, 2 = mit Arabinose und IPTG induziertes *E. coli* BL21 Zelllysate, 3 = mit Tetracyklin und IPTG induziertes *E. coli* BL21 Zelllysate, 4 = mit Arabinose, Tetracyklin und IPTG induziertes *E. coli* BL21 Zelllysate. * markiert GST-PlaB Bande im Coomassie-Gel.

3.1.3.2 Expression und Reinigung von PlaB mit MBP-Fusion

MBP (43 kDa) wird in der Literatur als ein sehr effektives Protein zur Löslichkeitssteigerung beschrieben (Kapust & Waugh, 1999, Nallamsetty & Waugh, 2006). Daher erschien die N-terminale Fusionierung von MBP mit PlaB als vielversprechend. Zu diesem Zweck wurde *plaB* in das pMal-c2E Plasmid kloniert und in *E. coli* BL21 zur Expression gebracht. Erste Expressionsversuche bei 37 °C ergaben, dass ein kleiner Anteil des Fusionsproteins löslich war (Daten nicht gezeigt). Um die Löslichkeit von MBP-PlaB zu steigern, wurden weitere Expressionsbedingungen (Temperatur, IPTG Konzentration), wie im Fall von GST-PlaB, getestet (s. Tab. 2.28). Die Induktion mit 0,1 mM IPTG und die darauf folgende Expression von MBP-PlaB (97 kDa) bei 18 °C für etwa 18 h erbrachten eine deutlich verbesserte Löslichkeit. Die Reinigung von MBP-PlaB aus einer 20 ml Bakterienkultur mittels Affinitätschromatographie führte zu einer Proteinausbeute in der Elutionsfraktion von 1,2 mg (Abb. 3.7). Aus der SDS-PAGE geht hervor, dass die Elutionsfraktionen nur zu einem geringen Anteil verunreinigt waren. Die gesammelte Elutionsfraktion wurde anschließend auf phospholipolytische Aktivität überprüft. In Abbildung 3.7 zeigt sich, dass MBP-PlaB sowohl PLA- als auch LPLA-Aktivität aufwies. Nach der Reinigung sollte MBP (43 kDa) von PlaB (54 kDa) mittels der Enterokinase Protease abgespalten werden. Der Verdau wurde bei den in Tabelle 2.29 aufgeführten Bedingungen durchgeführt und mittels SDS-PAGE überprüft. Anhand der SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung wird ersichtlich, dass zwischen 85 und 100 kDa eine starke Bande sowohl vor als auch nach dem Verdau zu erkennen ist (Abb. 3.7). Zwei sehr schwache Banden werden nach 24-stündiger Inkubationszeit bei etwa 54 kDa und 43 kDa sichtbar. Dies deutet darauf hin, dass die Inkubation der Elutionsfraktion mit Enterokinase nicht zur gewünschten, vollständigen Abspaltung des MBP-Restes von PlaB führte. Aus diesem Grund wurden weitere Konstrukte getestet, welche sich in der Proteaseschnittstelle unterschieden (s. Tab. 2.29).

Die Expressionsbedingungen und die affinitätschromatographische Reinigung wurden für die zwei weiteren Konstrukte (pKK7 und pKK18) nicht verändert. Der Verdau von MBP-PlaB mit der Protease Faktor Xa wurde ebenfalls unter verschiedenen Bedingungen getestet (s. Tab. 2.29).

Die SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung zeigt, dass nach dem Verdau mit Faktor Xa ebenfalls eine deutliche Bande zwischen 85 und 100 kDa blieb (Abb. 3.8 A). Aber im Gegensatz zum Enterokinase-Verdau erscheint in Höhe von 54 kDa eine ausgeprägtere Bande mit zunehmender Inkubationszeit. Zugleich wird nach dem Verdau ebenfalls eine Bande bei etwa 43 kDa sichtbar (Abb. 3.8 A).

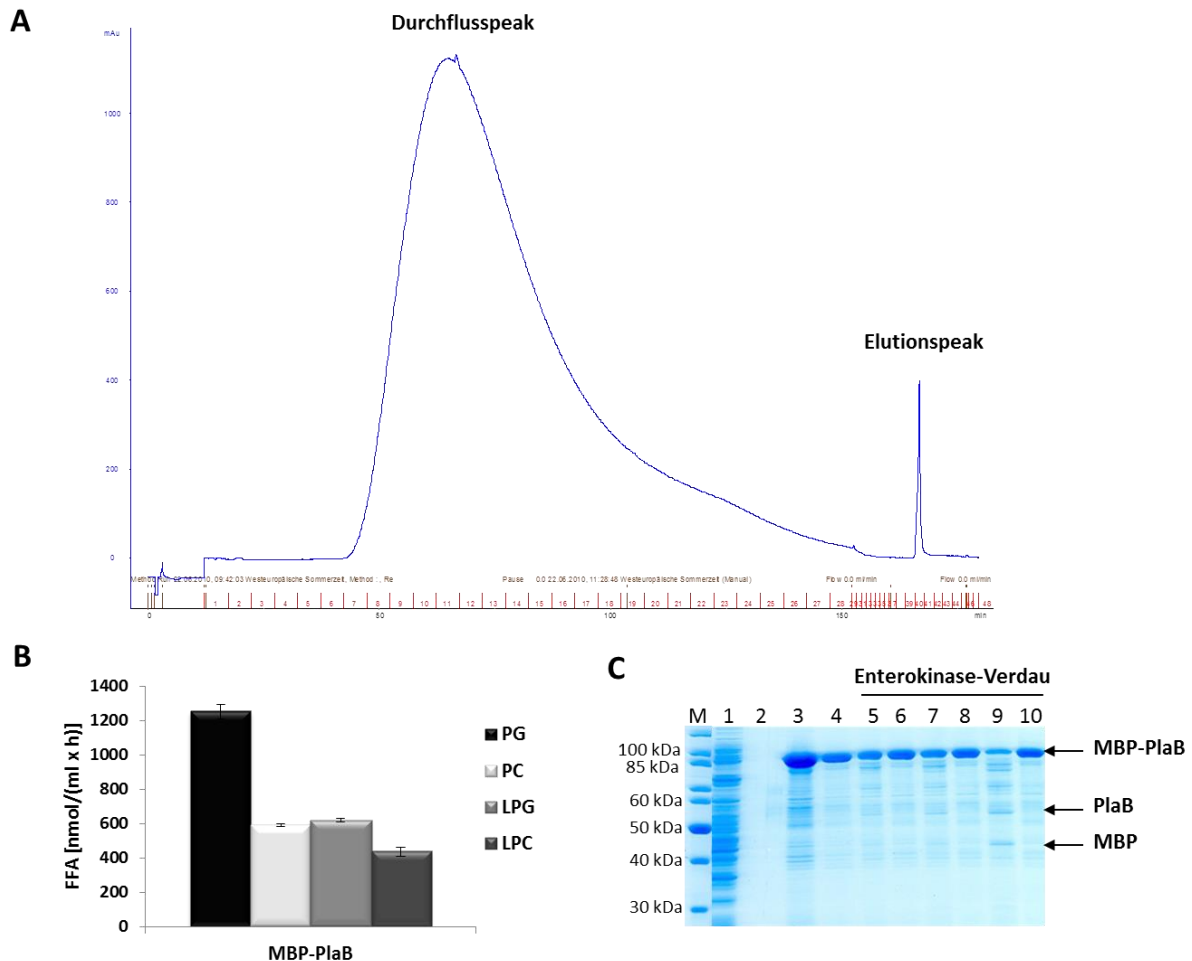
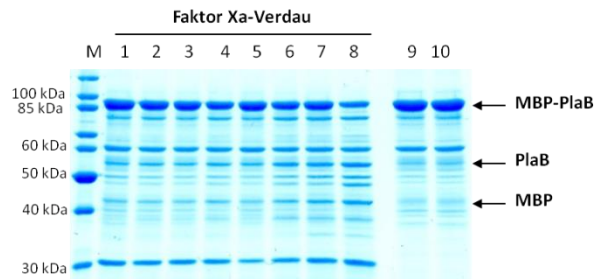


Abb. 3.7: Affinitätschromatographische Reinigung von MBP-PlaB mit anschließendem Enterokinase-Verdau. Der Überstand nach Zellaufschluss einer 20 ml *E. coli* BL21 (pKK4) Kultur (Expressionsbedingungen: 18 h bei 18 °C; Induktion: 0,1 mM IPTG) wurde auf eine 1 ml MBPTrap Säule geladen. MBP-PlaB wurde anschließend mittels 20 mM Maltose in Tris-Puffer eluiert. **A)** Chromatogramm des Reinigungsverlaufes (A_{280} nm). **B)** Die gesammelte Elutionsfraktion wurde 1:100 verdünnt auf phospholipolytische Aktivität gegenüber PG, PC, LPG und LPC überprüft. **C)** Reduzierende SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung zeigt ausgewählte Fraktionen der affinitätschromatographischen Reinigung sowie des Enterokinase-Verdau bei 23 °C nach 2, 4 und 24 h. Spuren: M = Proteinmarker, 1 = Durchflussfraktion, 2 = Waschfraktion, 3-4 = Elutionsfraktionen, 5 = Elutionsfraktion mit Enterokinase nach 2 h Verdau, 6 = Elutionsfraktion ohne Enterokinase nach 2 h Verdau, 7 = Elutionsfraktion mit Enterokinase nach 4 h Verdau, 8 = Elutionsfraktion ohne Enterokinase nach 4 h Verdau, 9 = Elutionsfraktion mit Enterokinase nach 24 h Verdau, 10 = Elutionsfraktion ohne Enterokinase nach 24 h Verdau.

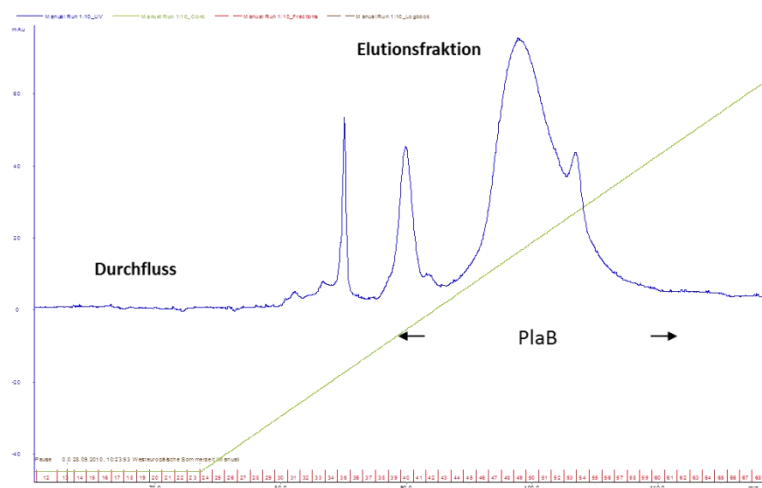
MBP-PlaB (97 kDa), PlaB (54 kDa) und MBP (43 kDa) sollten nun nach dem unvollständigen Verdau getrennt werden. Dazu wurde eine Anionenaustauschchromatographie (AEC) durchgeführt. Da der verwendete Puffer etwa eine pH-Einheit über dem pI von PlaB (8,3) und weit über dem pI von MBP (4,88) und MBP-PlaB (6,13) liegt, müssten alle drei Proteine an der Matrix der AEC-Säule binden und erst über die Ionenstärke getrennt werden. Im Chromatogramm der AEC wurden drei Peaks detektiert (Abb. 3.8 B). Eine SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung gab Aufschluss über die Proteinzusammensetzung der einzelnen Fraktionen. Die Abbildung 3.8 C verdeutlicht, dass die 54 kDa Bande (PlaB) nicht von der 97 kDa und der

43 kDa Bande getrennt wurde. Durch weitere Versuche, z.B. die Absenkung des pH-Wertes des Puffers oder die Änderung des Stufengradienten, konnten PlaB, MBP und MBP-PlaB ebenfalls nicht voneinander getrennt werden.

A



B



C

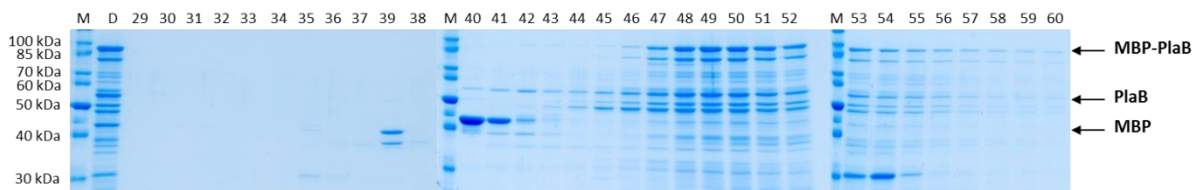


Abb. 3.8: Faktor Xa-Verdau von MBP-PlaB mit anschließender Anionenaustauschchromatographie. Der Überstand nach Zellaufschluss einer 20 ml *E. coli* BL21 (pKK7) Kultur (Expressionsbedingungen: 18 h bei 18 °C; Induktion: 0,1 mM IPTG) wurde auf eine 1 ml MBPTrap Säule geladen. MBP-PlaB wurde anschließend mittels 20 mM Maltose in Tris-Puffer eluiert. **A)** Reduzierende SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung zeigt Faktor Xa-Verdau bei 4 und 16 °C nach 2, 4, 6 und 24 h. Spuren: M = Proteinmarker, 1 = 2 h Verdau bei 4 °C, 2 = 2 h Verdau bei 16 °C, 3 = 4 h Verdau bei 4 °C, 4 = 4 h Verdau bei 16 °C, 5 = 6 h Verdau bei 4 °C, 6 = 6 h Verdau bei 16 °C, 7 = 24 h Verdau bei 4 °C, 8 = 24 h Verdau bei 16 °C, 9 = ohne Faktor Xa nach 24 h Verdau bei 4 °C, 10 = ohne Faktor Xa nach 24 h Verdau bei 16 °C. **B)** Chromatogramm der AEC nach erfolgtem Faktor Xa-Verdau. **C)** Reduzierende SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung der gesammelten Fraktionen (je 1 ml) aus der AEC. Spuren: M = Proteinmarker, 29-60 = Elutionsfraktionen.

Ein letzter Versuch zur vollständigen Abspaltung der MBP-Fusion von PlaB wurde mit der Prescission Protease durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass die Effizienz des Verdaus vergleichbar war mit der von Faktor Xa (Daten nicht gezeigt). Die Fusionierung von MBP an PlaB ermöglichte die Reinigung von löslichem und aktivem Protein. Weitere Versuche, MBP von PlaB effizient abzuspalten und PlaB separat in größeren Mengen anzureichern waren jedoch mit diesem löslichkeitsvermittelnden Tag ebenfalls nicht möglich.

Die bisherigen Reinigungsansätze zeigten zudem, dass PlaB zur Aggregation neigt, was eine Gewinnung in Reinform erschwerte.

3.1.3.3 Expression und Reinigung von PlaB mit Strep-Fusion

Der Strep-Tag ist ein kleines, aus acht Aminosäuren (~1 kDa) bestehendes Fusionspeptid. Als besonderer Vorteil wird in der Literatur erwähnt, dass er die Proteinfaltung und Sekretion seines Fusionspartners nicht beeinträchtigt und vor allem die Proteinfunktion nicht behindert (Schmidt & Skerra, 2007). Dieser Tag bietet sich zur Verwendung bei Analysen funktioneller Proteine an, zumal er biochemisch inert ist. Zudem wird durch die affinitätschromatographische Reinigung sehr reines Protein in guter Ausbeute erhalten, was seine Anwendung in der Proteinkristallisation begünstigt (Lichty *et al.*, 2005, Korndörfer *et al.*, 2004). Daher wurde *plaB* in das pGP172-Plasmid kloniert und das entsprechende rekombinante Fusionsprotein mittels 2 mM IPTG in *E. coli* BL21 induziert und bei 20 °C für 18 h exprimiert. Die affinitätschromatographische Reinigung des PlaB-Proteins mit N-terminaler Strep-Fusion (s. 2.2.5.2) aus einer 1 l Bakterienkultur führte zu einer Proteinausbeute von ~5 mg (Abb. 3.9 A). Die SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung zeigt, dass die Elutionsfraktionen einen höheren Reinheitsgrad aufwiesen im Vergleich zur Reinigung von PlaB mit N-terminaler MBP-Fusion (vergleiche Abb. 3.7, 3.8). Neben PlaB ist nur noch eine sehr schwache Bande oberhalb von 70 kDa und eine kaum sichtbare Bande bei ca. 60 kDa im Coomassie-Gel erkennbar. Eine massenspektrometrische Untersuchung dieser zwei Banden ergab, dass es sich um das Chaperon DnaK (70 kDa) und ein Chaperonin (GroEL, 60 kDa) handelte.

Eine anschließende Überprüfung der phospholipolytischen Aktivität ergab, dass das rekombinant exprimierte und affinitätschromatographisch gereinigte Strep-PlaB sowohl PLA-Aktivität als auch LPLA-Aktivität besaß (Abb. 3.9 und 3.3). Weiterhin war es nun möglich, die Aktivität pro Masseneinheit von PlaB, also die spezifische Aktivität, zu berechnen. Dafür wurde der Umsatz an FFA durch 0,05 ng Strep-PlaB innerhalb von 60 min ermittelt (Abb. 3.9 C).

Die N-terminale Fusionierung des Strep-Peptides an PlaB schaffte die Voraussetzung für die Reinigung von löslichem und aktivem Protein. Da das Strep-Peptid nur 8 Aminosäuren groß ist und, wie anfangs schon erwähnt, inerte Eigenschaften besitzt, war eine Abspaltung des Strep-Tags nicht erforderlich. Der Reinheitsgrad der Elutionsfraktionen und die gute Ausbeute ermöglichten

im Folgenden die Erzeugung eines polyklonalen Antiserums gegen PlaB sowie die strukturelle Charakterisierung des Enzyms.

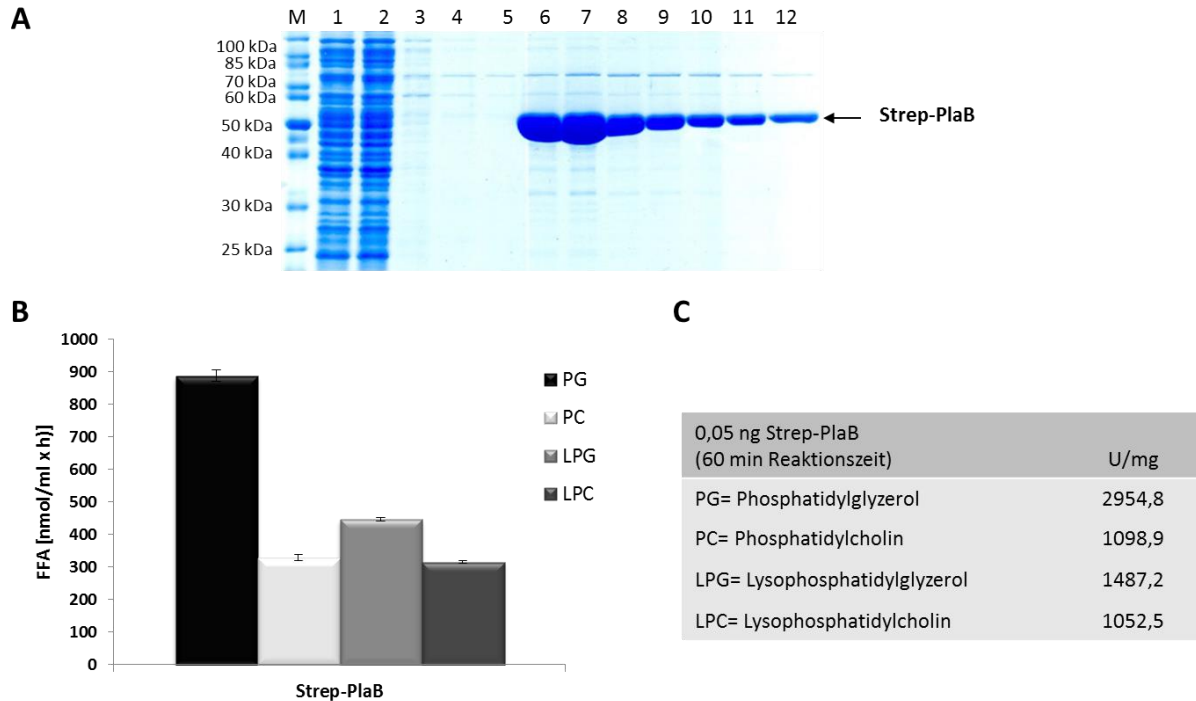


Abb. 3.9: Affinitätschromatographische Reinigung von Strep-PlaB. Der Überstand nach Zellaufschluss einer 1 l *E. coli* BL21 (pKK19) Kultur wurde auf eine 1 ml StrepTactin-Säule geladen. Strep-PlaB wurde anschließend mit 8 mM Desthiobiotin in Tris-Puffer eluiert. **A)** Reduzierende SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung zeigt ausgewählte Fraktionen der affinitätschromatographischen Reinigung. Spuren: M = Proteinmarker, 1 = löslicher Überstand nach Zellaufschluss 2 = Durchfluss, 3-5 = Waschfraktionen, 6-12 = Elutionsfraktionen. **B)** 0,01 µg/ml gereinigtes Strep-PlaB wurde auf phospholipolytische Aktivität gegenüber PG, PC, LPC und LPG überprüft. Die Reaktion wurde für 60 min bei 37 °C durchgeführt. **C)** Tabellarische Darstellung der spezifischen Aktivität [U/mg = µmol/ (min x ml)] von PlaB zusammen mit PG, PC, LPG, LPC.

3.1.3.4 Gewinnung eines polyklonalen Antikörpers gegen PlaB

In der Vergangenheit wurden bereits Versuche unternommen, einen Antikörper gegen PlaB zu generieren. Dazu wurden sowohl synthetisch hergestellte PlaB-Peptide als auch aus der SDS-PAGE extrahierte Banden des rekombinant exprimierten und gereinigten Calmodulinbindeprotein-PlaB zur Immunisierung eingesetzt (Schunder, 2010*). Die damals gewonnenen α-PlaB Antikörper detektierten in Western Blot Analysen von *L. pneumophila* Wildtyp Lysat jedoch kein PlaB (Schunder, 2010*). Im Rahmen dieser Arbeit wurde deswegen ein weiterer Ansatz zur Generierung eines polyklonalen Antiserums gegen PlaB verfolgt. Dazu wurde die katalytisch inaktive Variante von PlaB, PlaB_{D203N}, als N-terminales Strep-Fusionsprotein in *E. coli* BL21 exprimiert und affinitätschromatographisch gereinigt (s. 3.1.3.3). Da PlaB hämolytische Eigenschaften besitzt, wurde zur Immunisierung zweier Kaninchen dieses enzymatisch inaktive, aber lösliche Protein gewählt. Nach Abschluss des 28-tägigen

Immunisierungsprotokolls (BioGenes) wurden mit Lysaten von *L. pneumophila* Corby Wildtyp, *L. pneumophila* Corby *plaB1* Mutante und der Komplementante *L. pneumophila* Corby *plaB1* (pJB04) sowie den Lysaten von *E. coli* BL21 (pKK19) und *E. coli* BL21 Western Blot Analysen durchgeführt. Es konnte eine Bande in Höhe der 55 kDa im Fall des *E. coli* BL21 (pKK19) Lysates detektiert werden, was der Größe von Strep-PlaB entspricht (Abb. 3.10 A). Allerdings erscheinen auch zwei starke Banden unterhalb der 55 kDa Bande und weitere schwache Banden oberhalb der 55 kDa Bande, welche ebenfalls beim *E. coli* BL21 Lysat detektiert wurden. Bezüglich der *L. pneumophila* Lysate konnte eine Bande bei ca. 54 kDa im Fall der Komplementante detektiert werden, was der Größe von PlaB entspricht. Bei allen eingesetzten *Legionella*-Stämmen wurden ebenfalls schwächere Banden oberhalb der 54 kDa Bande sichtbar (Abb. 3.10 B). Um die unspezifischen Kreuzreaktionsbanden zu reduzieren, wurde das Antiserum gegen die Zelllysate von *E. coli* BL21 bzw. *L. pneumophila* *plaB1* präadsorbiert (s. 2.2.6). Wie in Abbildung 3.10 ersichtlich wird, konnten durch die Präadsorption die Kreuzreaktionsbanden verringert werden. Aus diesem Grund wurde in der gesamten Arbeit nur mit dem präadsorbierten Antiserum gearbeitet. Mit diesem war es auch zum ersten Mal möglich PlaB im Lysat des *L. pneumophila* Wildtyps zu detektieren (Abb. 3.10 B).

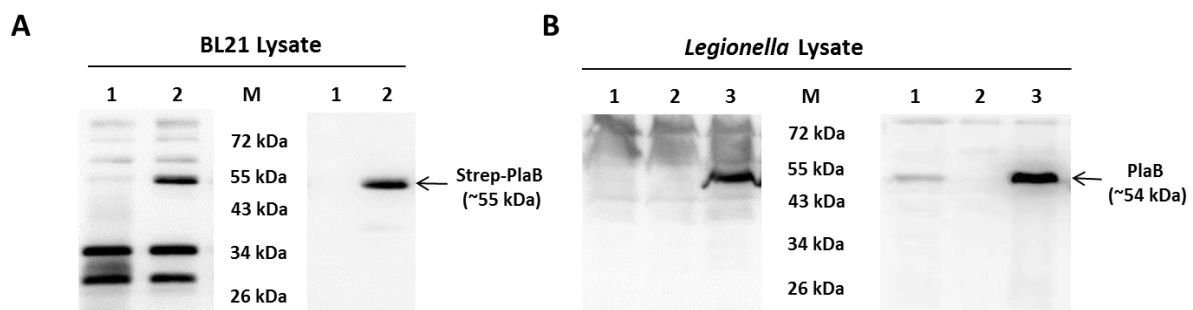


Abb. 3.10: Western Blot Analyse zur Überprüfung des α -PlaB Antiserums. **A)** *E. coli* BL21 Zelllysate mit und ohne Strep-PlaB wurden mittels Western Blot mit dem α -PlaB Antiserum (links) bzw. mit dem gegen *E. coli* BL21 Zelllysate präadsorbierten α -PlaB Antiserum (rechts) untersucht. Spuren: 1 = *E. coli* BL21 Lysat, 2 = *E. coli* BL21 (pKK19) Lysat **B)** Lysate von *L. pneumophila* Corby Wildtyp, *L. pneumophila* Corby *plaB1* Mutante und der Komplementante *L. pneumophila* Corby *plaB1* (pJB04) wurden mittels Western Blot mit dem α -PlaB Antiserum (links) bzw. mit dem gegen *L. pneumophila* Corby *plaB1* Zelllysate präadsorbierten α -PlaB Antiserum (rechts) untersucht. Spuren: 1 = *L. pneumophila* Corby Wildtyp Lysat, 2 = *L. pneumophila* Corby *plaB1* Lysat, 3 = *L. pneumophila* Corby *plaB1* (pJB04) Lysat (Komplementante), M = Proteinmarker.

3.2 Strukturelle Charakterisierung von PlaB

PlaB teilt einige Eigenschaften mit PLAs der äußeren Membran (OMPLA) einiger enteropathogener Bakterien, wie z.B. *E. coli* und *Campylobacter ssp.*. Wie anfangs bereits erwähnt wurde, ist in diesem Zusammenhang bekannt, dass PlaB, sowie auch OMPLA, eine zellassoziierte PLA und LPLA mit zusätzlicher hämolytischer Aktivität ist (Grant *et al.*, 1997, Istivan *et al.*, 2008, Dekker, 2000, Flieger *et al.*, 2004). Für OMPLA aus *E. coli* ist weiterhin bekannt, dass die Dimerisierung die enzymatische Aktivität reguliert (Dekker *et al.*, 1997). Dieses Charakteristikum wurde für PlaB bisher noch nicht untersucht.

3.2.1 Untersuchungen zum Oligomerisierungsgrad von PlaB

Um zunächst die Frage zu klären, ob PlaB verschiedene oligomere Zustände besitzt, wurde der Oligomerisierungsgrad des gereinigten Strep-Fusionsproteins vergleichend mit Hilfe analytischer Größenausschlusschromatographie (SEC), chemischer Quervernetzung, Massenspektrometrie, analytischer Ultrazentrifugation (AUZ) und der Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS) analysiert.

3.2.1.1 Homodimerisierung

Die analytische SEC bietet den Vorteil, die Analyse eines Proteins in verschiedenen Puffersystemen und somit auch unter physiologischen Bedingungen durchzuführen. Die Kalibrierung der Säule mit Proteinen bekannter Größe ermöglicht es, die molekulare Größe des vorliegenden Oligomeres abzuschätzen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Superdex 200 10/300 GL Säule eingesetzt, welche einen Auftrennungsbereich von 10 bis 600 kDa besitzt. Für die Analyse wurde sowohl HEPES- als auch Tris-Puffer verwendet, um einen möglichen Einfluss der Pufferbedingungen auf den oligomeren Zustand des zu untersuchenden Proteins auszuschließen. Beide Puffersysteme erbrachten gleiche Resultate. In Abbildung 3.11 ist repräsentativ das Ergebnis mit HEPES-Puffer gezeigt. Die SEC von 500 µg (1 mg/ml; 18,6 µM) gereinigtem Strep-PlaB zeigte einen Elutionspeak beginnend bei 12,5 ml (Spur 4 in Abb. 3.11 C) und endend bei 15,5 ml (Spur 9, Abb. 3.11 C). Das Maximum des Elutionspeaks liegt bei 13,6 ml (Spur 6, Abb. 3.11 C), was einem apparenten MG von ~110 kDa entspricht (Abb. 3.11). Da das aus der Aminosäuresequenz theoretisch berechnete MG des monomeren Strep-PlaB 55,3 kDa beträgt, entspricht das apparente MG einem Dimer. Die dazu korrespondierende SDS-PAGE mit anschließendem α-PlaB Western Blot bzw. einer Coomassie-Färbung belegte das Vorhandensein von Strep-PlaB innerhalb von 12,5 ml bis 15,5 ml, wobei entsprechend dem Maximum des Elutionspeaks in Spur 6 der Abbildung 3.11 C die stärkste Bande detektiert wurde (Abb. 3.11).

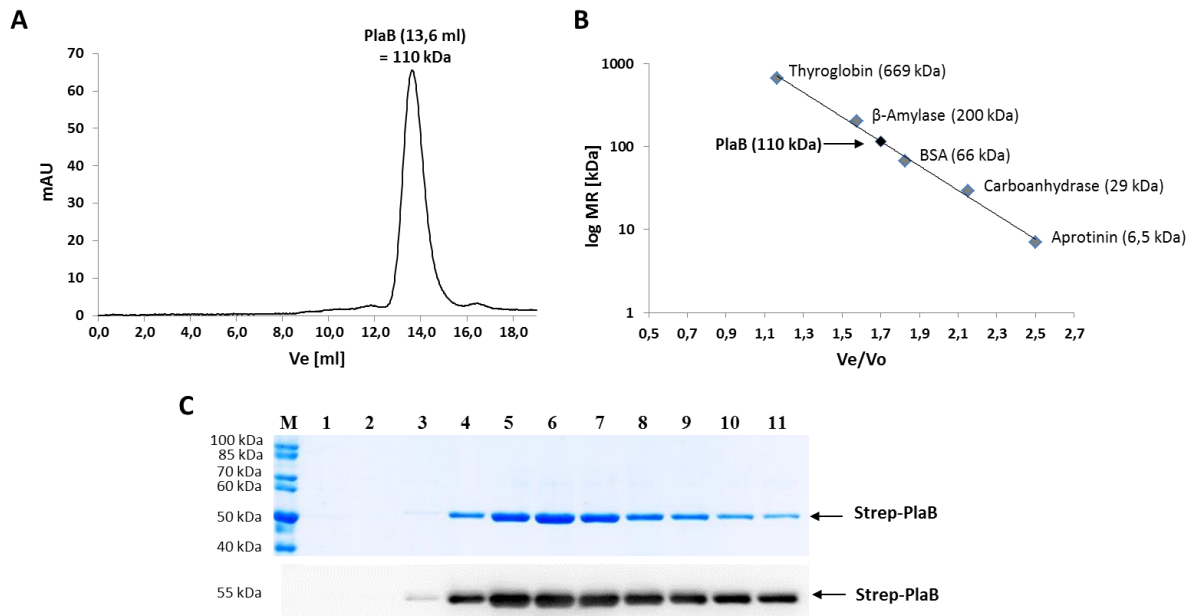


Abb. 3.11: Analyse mittels Größenausschlusschromatographie (SEC) zur Ermittlung des Oligomerisierungsgrades von PlaB. 500 µl 1 mg/ml (18,6 µM) in *E. coli* BL21 (pKK19) exprimiertes und gereinigtes Strep-PlaB wurden größenchromatographisch mittels einer Superdex 200 10/300 GL Säule getrennt. **A)** Chromatogramm der SEC mit 50 mM HEPES-Puffer pH 7,5. **B)** Anhand der Kalibrierungskurve konnte das apparente Molekulargewicht von Strep-PlaB ermittelt werden. V_e = Elutionsvolumen von Strep-PlaB bzw. der Proteinstandards, V_o = Leervolumen von 8 ml **C)** Reduzierende SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung (oben) bzw. α -PlaB Western Blot (unten) der Elutionsfraktionen. Spuren: M=Proteinstandard, 1-11 = V_e ab 11,0 ml bis 16,0 ml in 0,5 ml Elutionsfraktionen. Die Daten sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

Die Analyse mittels SEC deutete darauf hin, dass das rekombinante PlaB mit sich selbst wechselwirkt und laut apparentem MG als Dimer vorliegt. Die anschließenden Quervernetzungsversuche mit Paraformaldehyd (Formaldehydlösung) wurden durchgeführt, um die Dimerisierung mittels einer weiteren Methode zu bestätigen. Das Lösen und Erhitzen von Paraformaldehyd lässt das Polymer in seine lösliche Form, dem Formaldehyd (FA), dissoziieren. Das kleine, reaktive FA-Molekül ist in der Lage, Proteine mittels Methylen-Brücken zu vernetzen. Primär werden Proteine dabei über auf der Oberfläche lokalisierte Lysin-, Tyrosin- oder Cystein-Reste miteinander verknüpft. Zur Quervernetzung wurde jeweils aus *E. coli* BL21 (pKK19) oder *L. pneumophila* *plaB1* (pKK43) Strep-fusioniertes PlaB gereinigt und ~1 mg/ml (18,6 µM) mit steigenden PFA-Konzentrationen (0-3%) für 30 min bzw. mit konstanter PFA-Konzentration unterschiedlich lang inkubiert. SDS wurde als Negativkontrolle eingesetzt, da dieses Detergenz zur Störung der Interaktion zwischen Proteinen führt (Abb. 3.12 C). Die Auftrennung der Proben mittels SDS-PAGE und anschließender α -PlaB Western Blot Analyse zeigte, dass nach der Quervernetzung von PlaB Signale im Bereich höherer molekularer Massen (~110 kDa, ~165 kDa) detektiert wurden (s. Abb. 3.12). Die Bande in Höhe von 110 kDa korrespondiert mit einem PlaB-Homodimer. Die zusätzliche Bande in Höhe von etwa 165 kDa könnte einem PlaB-Homotrimer

oder einem Komplex von PlaB mit einem unbekannten Protein zugeordnet werden. Weiterhin wurde ebenfalls das Monomer (55 kDa) nach der Quervernetzung detektiert, was dem Anteil an nicht quervernetztem Protein entsprechen könnte. Das Signal in Höhe von etwa 85 kDa ist einer unspezifischen Bindung des α -PlaB Antikörpers zuzuordnen, da diese ebenfalls bei den Kontrollen, PlaB mit 1% SDS und ohne PFA, sowie bei vorangegangenen Western Blots auftrat (s. Abb. 3.12 A und C, vergleiche Abb. 3.10). Dieses Signal schwächt mit zunehmender PFA-Konzentration ab und wurde bei 3% PFA nicht mehr detektiert (Abb. 3.12. A). In Abbildung 3.12 A und B ist deutlich zu erkennen, dass mit steigender PFA-Konzentration die Stärke der höhermolekularen Signale zunahm (110 kDa, 165 kDa), aber das Signal in Höhe von 85 kDa abschwächte (Abb 3.12 A). Die Abbildung 3.12 C verdeutlicht, dass mit längerer Inkubationszeit die Stärke der höhermolekularen Signale ebenfalls zunahm.

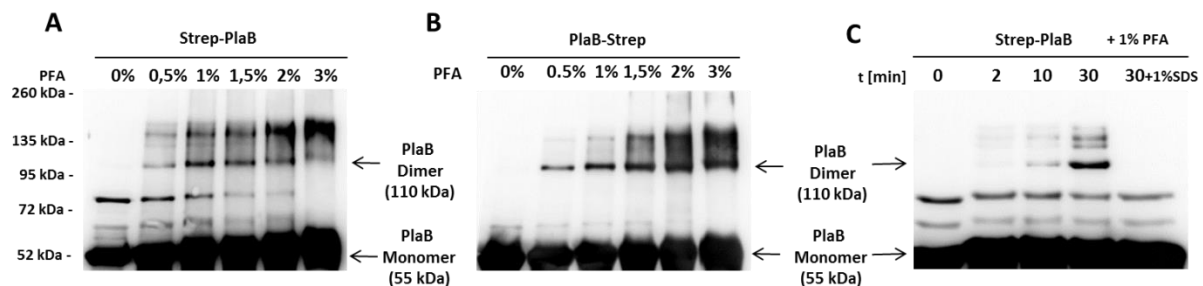


Abb. 3.12: Quervernetzungsanalyse mit Paraformaldehyd (PFA) zur Ermittlung des Oligomerisierungsgrades von PlaB. Für die Analysen wurde in *E. coli* BL21 (pKK19) und *L. pneumophila* *plaB1* (pKK43) exprimiertes und gereinigtes Strep-PlaB verwendet. ~1 mg/ml (18,6 μ M) Protein aus *E. coli* BL21 (A, C) bzw. aus *L. pneumophila* *plaB1* (B) wurde mit 0-3% PFA für 30 min (A, B) oder mit 1% PFA für 0-30 min (C) bei Raumtemperatur inkubiert und mittels reduzierender 7,5% SDS-PAGE mit anschließendem α -PlaB Western Blot analysiert. Die Daten sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

3.2.1.2 Homotetramerisierung

Da bei den Quervernetzungsversuchen (s. 3.2.1.1) neben dem Signal in Höhe des PlaB-Homodimers ebenso Signale im höhermolekularen Bereich auftraten, kam eine weitere Methode zur Bestimmung des Oligomerisierungsgrades zur Anwendung. Die Technik der Massenspektrometrie erlaubt die konkrete Bestimmung des MG komplexer biologischer Makromoleküle, wie z.B. von Proteinkomplexen. Die Massengenauigkeit liegt bei etwa 0,01%, d.h. ein Protein mit dem MG von 10.000 kann auf ± 1 Dalton (Da) genau bestimmt werden. Für die MALDI-TOF Analyse wurde aus *L. pneumophila* *plaB1* (pKK43) Strep-fusioniertes PlaB gereinigt und in einen flüchtigen Puffer mittels Dialyse überführt (s. 2.2.4.6). Die massenspektrometrische Untersuchung des in Ammoniumacetat-Puffers gelösten PlaB-Strep wurde in Kooperation mit Dr. Manfred Nimtz (Zelluläre Proteomforschung, HZI, Braunschweig)

durchgeführt. Das Massenspektrum in Abbildung 3.13 zeigt vier Hauptsignale bei 54.714, 110.680, 166.839 und 222.343 Da. Diese Signale können anhand der Masse einem PlaB-Strep Monomer, Homodimer, Homotrimer und Homotetramer zugeordnet werden. Es ist auffällig, dass das Signal bei 166.839 Da in seiner Intensität geringer ist als das Signal bei 222.343 Da, was darauf hindeutet, dass das Trimer ein laserinduziertes Artefakt ist (Abb. 3.13).

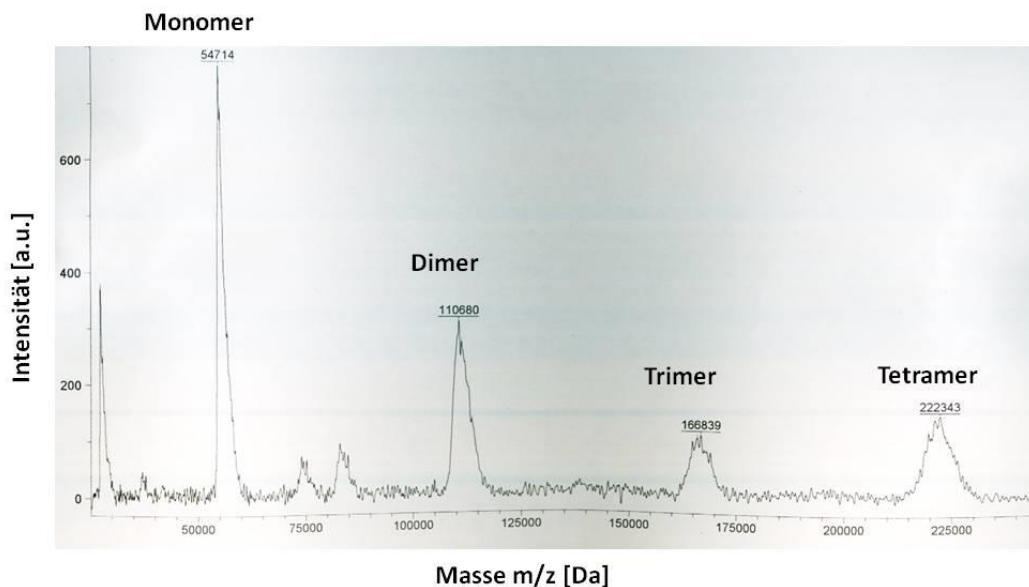


Abb. 3.13: Massenspektrum der MALDI-TOF Analyse von PlaB-Strep. In *L. pneumophila* *plaB1* (pKK43) exprimiertes und gereinigtes PlaB-Strep wurde für die Analysen in Ammoniumacetat-Puffer überführt und das Molekulargewicht mittels MALDI-TOF bestimmt.

Die AUZ wurde als weitere Methode hinzugezogen, um die in der Massenspektrometrie detektierten oligomeren Zustände von PlaB zu validieren. Mit der Sedimentations-Geschwindigkeitszentrifugation (SV) kann der Sedimentationskoeffizient $c(s)$ von Proteinen bestimmt werden, womit Aussagen über Homogenität der Probe und über die hydrodynamischen Eigenschaften eines Proteins getroffen werden können. Bei dieser Art Experiment wird eine Konzentrationsverteilung innerhalb der Messzelle registriert, die direkt in eine Sedimentationskoeffizientenverteilung ($c(s)$ -Verteilung) umgerechnet werden kann. Die Analysen wurden in Kooperation mit Frau PD Dr. Curth (MHH, Hannover) durchgeführt. Dazu wurden Konzentrationen von 5,4 μM bis 24,4 μM (0,3 mg/ml bis 1,35 mg/ml) von in *E. coli* BL21 (pKK19) exprimiertem und affinitätschromatographisch gereinigtem Strep-PlaB eingesetzt. Die Auswertung mit dem Programm SedFit, welches für die verschiedenen Konzentrationen $c(s)$ -Verteilungen berechnete, zeigte, dass der größte Anteil der Probe mit einem $s_{20,W}$ -Wert von 9,7 S sedimentierte (Abb. 3.14 A). Dieser Wert übersteigt den rechnerischen s-Wert eines kugelförmigen hydratisierten Trimers leicht, sodass Strep-PlaB vermutlich als Tetramer vorliegt.

Aus der Diffusionsverbreiterung der sedimentierenden Grenzschicht und dem Sedimentationskoeffizienten ließ sich das MG des Proteins abschätzen, welches etwa 200 kg/mol (kDa) betrug. Strep-PlaB bildet demnach in dem analysierten Konzentrationsbereich ein Homotetramer mit einem Perrin-Faktor (Verhältnis des gemessenen Reibungskoeffizienten zum Reibungskoeffizienten einer Kugel mit gleicher Molmasse) von 1,33. Dieser Faktor korreliert mit einem hydrodynamischen Radius von 5,34 nm, welcher ein Maß für die räumliche Ausdehnung eines Partikels darstellt. Da für ein hydratisiertes kugelförmiges Protein dieser Faktor zwischen 1,1 und 1,2 liegen müsste, weicht das Tetramer vermutlich von der Kugelform ab. Zur genaueren Bestimmung des MG von Strep-PlaB wurde die Sedimentations-Diffusions-Gleichgewichtsmethode (SE) angewandt. Aus der $c(s)$ -Verteilung der SV-Analyse ging zudem hervor, dass sich in der Proteinpräparation Aggregate befanden. Daher wurde für die SE-Analyse Strep-PlaB zusätzlich mittels SEC gereinigt. Bei einer Proteinkonzentration von 10,4 μM (0,57 mg/ml) ergab die Analyse mit Hilfe des Modells einer einzelnen Spezies ein MG von 218 kg/mol, was den tetrameren Zustand von Strep-PlaB in der SV-Analyse bestätigte.

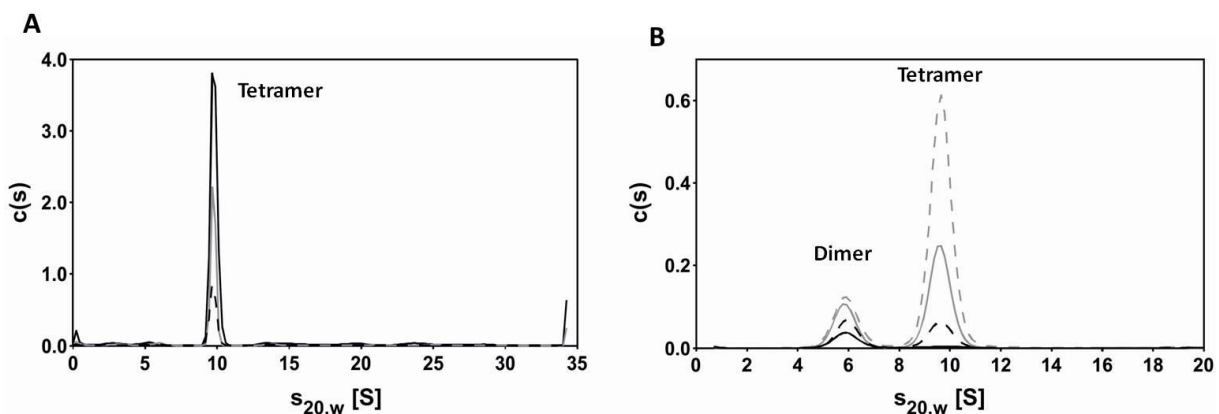


Abb. 3.14: Analytische Ultrazentrifugation zur Validierung des Oligomerisierungsgrades von PlaB. A) Die $c(s)$ -Verteilung höherer Konzentrationen [5,4 μM (schwarz gestrichelte Linie); 10,8 μM (graue Linie); 24,4 μM (schwarze Linie)] von in *E. coli* BL21 (pKK19) exprimiertem und gereinigtem Strep-PlaB zeigte, dass Strep-PlaB hauptsächlich in Form eines Tetramers mit 9,7 S sedimentierte. Die Messung der Absorption erfolgte bei 280 nm. B) Bei niedrigeren Proteinkonzentrationen [0,13 μM (schwarze Linie); 0,27 μM (schwarz gestrichelte Linie); 0,54 μM (graue Linie); 1,1 μM (grau gestrichelte Linie)] wurden zwei Proteinspezies detektiert. Laut der $c(s)$ -Verteilung sedimentierten das Tetramer mit 9,3 S und das Dimer mit 5,9 S. Das verwendete Strep-PlaB wurde zusätzlich mittels SEC gereinigt und die Absorption wurde bei 230 nm gemessen.

Die SV-Analyse wurde zum Vergleich auch bei niedrigeren Proteinkonzentrationen durchgeführt (kleiner 5,4 μM bzw. 0,3 mg/ml). Da sich die Absorption bei 280 nm schon bei 5,4 μM (0,3 mg/ml) am Detektionslimit befand, wurde die Sedimentation im Folgenden bei 230 nm verfolgt, wo eine höhere Sensitivität der Detektion erreicht wird. Die verdünnten Proben wurden für 7 h bei 10 °C inkubiert, damit die Einstellung eines Gleichgewichtes ermöglicht werden konnte. Die $c(s)$ -Analyse zeigte, dass das Tetramer von Strep-PlaB bei geringeren

Proteinkonzentrationen zunehmend dissoziierte (Abb. 3.14 B). Eine zweite Spezies wurde bei 5,9 S beobachtet. Die langsamer sedimentierende Spezies entspricht wahrscheinlich einem Homodimer, da der s-Wert höher als der eines kugelförmigen Monomers ist und die c(s)-Analyse eine Molmasse von etwa 110 kg/mol ergab. Für das PlaB-Dimer wurde ein Perrin-Faktor von 1,38 kalkuliert, was sich mit dem Wert des Tetramers deckt. Abbildung 3.14 B verdeutlicht ebenfalls, dass sich das Gleichgewicht mit zunehmender Verdünnung immer mehr auf die Seite der Dimere verschob und bei 0,13 μM (0,007 mg/ml) fast vollständig auf der Seite der Dimere lag. Damit zeigte die Analyse der AUZ, dass sich PlaB bei niedrigeren Konzentrationen (im mikromolaren Bereich) in einem Tetramer-Dimer-Gleichgewicht befindet, welches sich mit zunehmender Verringerung der Proteinkonzentration auf die Seite des Dimers verlagert.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse der SEC- und der Quervernetzungsversuche darauf hin, dass sich PlaB zu einem Homodimer zusammenlagert. Weiterhin konnte mittels Massenspektrometrie eine weitere höhermolekulare Spezies, das Homotetramer, von PlaB identifiziert werden. Sowohl das Homodimer als auch das Homotetramer konnten mit Hilfe der AUZ-Analysen bestätigt werden. Es zeigte sich, dass sich PlaB in einem konzentrationsabhängigen Gleichgewicht befindet, wobei das Tetramer bei einer Proteinkonzentration von 0,13 μM (0,007 mg/ml) fast vollständig zum Dimer dissoziierte. Bei Proteinkonzentrationen oberhalb von 5,4 μM (0,3 mg/ml) liegt PlaB als Tetramer vor.

3.2.2 Berechnung eines SAXS-Modells von PlaB

Die Methode der Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS) ermöglicht die niedrig auflösende Bestimmung der dreidimensionalen Ausdehnung eines Proteins bzw. Proteinkomplexes in Lösung und gibt somit Informationen über die Form und Größe des Makromoleküls (Svergun *et al.*, 2001, Mertens & Svergun, 2010). Die SAXS-Messungen sollten die bisherigen Ergebnisse in Bezug auf den Oligomerisierungsgrad von PlaB verifizieren und zudem strukturelle Informationen liefern. Die SAXS-Messungen wurden mit in *E. coli* BL21 (pKK19) exprimiertem und affinitätschromatographisch gereinigtem Strep-PlaB (1 mg/ml; 18,6 μM) in Kooperation mit Prof. Manfred Rössle (EMBL, Hamburg) durchgeführt. Aus der Streukurve berechnete Dr. Jörn Krauß (HZI, Braunschweig) unter der Annahme einer D_2 -Symmetrie ein *ab initio* Modell von PlaB (Abb. 3.15).

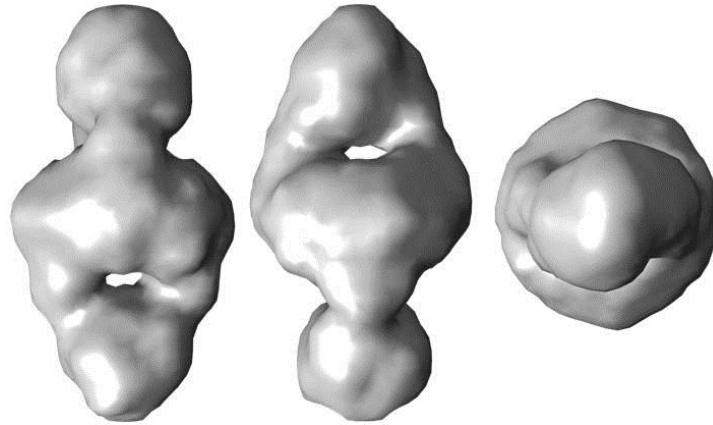


Abb. 3.15: SAXS-Modell von PlaB. Für das Experiment wurde 1 mg/ml in *E. coli* BL21 (pKK19) exprimiertes und gereinigtes Strep-PlaB eingesetzt. Das aus dem Röntgenkleinwinkelstreuungsexperiment ermittelte *ab initio* Modell von PlaB zeigt eine tetramere Struktur aus zwei miteinander verbundenen Dimeren. Zur Modellierung der berechneten Struktur wurde eine D_2 -Symmetrie zugrunde gelegt. Von links nach rechts: Vorder-, Seiten-, Draufsicht.

Modellrechnungen unter der Annahme einer C_2 - (dimeres Protein) oder C_4 - Symmetrie (Tetramer mit zirkulärer Anordnung der Monomere) resultierten in einer unüblichen und daher physikalisch unwahrscheinlichen Proteinform (Daten nicht gezeigt). Der von der Streukurve ermittelte Gyrationradius (R_G) von 5,16 nm ist kompatibel mit dem hydrodynamischen Radius und dem Perrinfaktor aus den AUZ-Experimenten und weist auf ein MG von ca. 200 kDa hin. Dieses Ergebnis impliziert, dass Strep-PlaB bei der im SAXS-Experiment eingesetzten Proteinkonzentration von 1 mg/ml (18,6 μ M) ein Tetramer ausbildete, was mit den Daten der AUZ-Experimente korreliert. Bei dieser hohen Proteinkonzentration war das Oligomerengleichgewicht zu Gunsten des Tetramers verschoben. Das dynamische Dimer-Tetramer-Gleichgewicht, welches bei den AUZ-Experimenten beobachtet wurde, lässt vermuten, dass sich das PlaB-Tetramer aus zwei dimerisierten Dimeren assembliert. Somit erscheint die D_2 -Symmetrie des Tetramers, was einem Dimer aus zwei Dimeren entspricht, sehr schlüssig.

Es wurden zudem Messungen mit geringeren Proteinkonzentrationen (< 0,3 mg/ml) durchgeführt, um strukturelle Informationen eines weiteren Oligomerisierungszustandes (Dimer) von PlaB zu erhalten. Für diese geringen Proteinkonzentrationen war diese Methode jedoch nicht sensitiv genug und lieferte keine auswertbaren Streuintensitäten.

3.2.3 Einfluss der letzten 15 Aminosäuren auf den Oligomerisierungsgrad von PlaB

Für die *E. coli* OMPLA konnte bereits gezeigt werden, dass die Dimerisierung des Enzyms die Aktivität reguliert (Dekker *et al.*, 1997). Bei den Untersuchungen zur enzymatischen Aktivität von PlaB wurde festgestellt, dass die letzten 15 Aminosäuren eine wichtige Rolle für die PLA- und LPLA-Aktivitäten spielen (s. 3.1.2.1). Es stellte sich somit die Frage, ob der Aktivitätsverlust mit einer Änderung des oligomeren Zustandes einhergeht. Vergleichende SAXS-Analysen und SEC-Experimente mit dem aus *E. coli* BL21 gereinigten Strep-PlaB sowie den drei C-terminal verkürzten Varianten mit Strep-Fusion sollten Aufschluss über diesen Aspekt geben. Wie anfangs erwähnt wurde, zeigten die CD-Spektren von PlaB und den drei C-terminal verkürzten Varianten von PlaB einen ähnlichen Kurvenverlauf. Somit verursachen die C-terminalen Verkürzungen vermutlich keine Konformationsänderung des Monomers.

Die SEC-Experimente wurden unter denselben Bedingungen, wie für das Volllängenkonstrukt beschrieben (s. 3.2.1.1), durchgeführt. Es stellte sich heraus, dass die C-terminal verkürzten Varianten von Strep-PlaB bei einer eingesetzten Proteinkonzentration von 0,7 bzw. 1 mg/ml ebenfalls einen Elutionspeak bei 13,6 ml zeigten (Abb. 3.16 A). Dies deutete darauf hin, dass sich der Oligomerisierungszustand der drei verkürzten Strep-Proteine im Vergleich zum Wildtypprotein nicht verändert hatte.

Im Folgenden wurden ebenfalls SAXS-Analysen bei einer Proteinkonzentration von 1 mg/ml, wie unter 2.2.8 beschrieben (s. auch 3.2.2), durchgeführt, um die SEC-Ergebnisse zu verifizieren. Der Vergleich der vier Streukurven ergab, dass die Werte bei niedriger Auflösung (entspricht niedrigen Werten der Impulsübertragung) für alle vier Strep-Proteine übereinstimmten (Abb. 3.16 B, linke Seite), was auf eine ähnliche Form und somit auch auf eine vergleichbare quaternäre Struktur von Wildtypprotein und den drei verkürzten Varianten bei dieser niedrigen Auflösung hindeutete. Die von den Streukurven ermittelten R_G -Werte von 5,31 nm für Strep-PlaB_{aa1-469}, 5,21 nm für Strep-PlaB_{aa1-464} und 5,10 nm für Strep-PlaB_{aa1-459} sind vergleichbar mit dem Wert von Strep-PlaB ($R_G = 5,16$ nm, s. auch 3.2.2), was auf einen tetrameren Zustand der drei verkürzten Varianten bei einer Proteinkonzentration von 1 mg/ml hinwies.

Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse der SEC- und SAXS-Analyse, dass die C-terminalen Verkürzungen den Oligomerisierungsgrad von PlaB nicht beeinflussen.

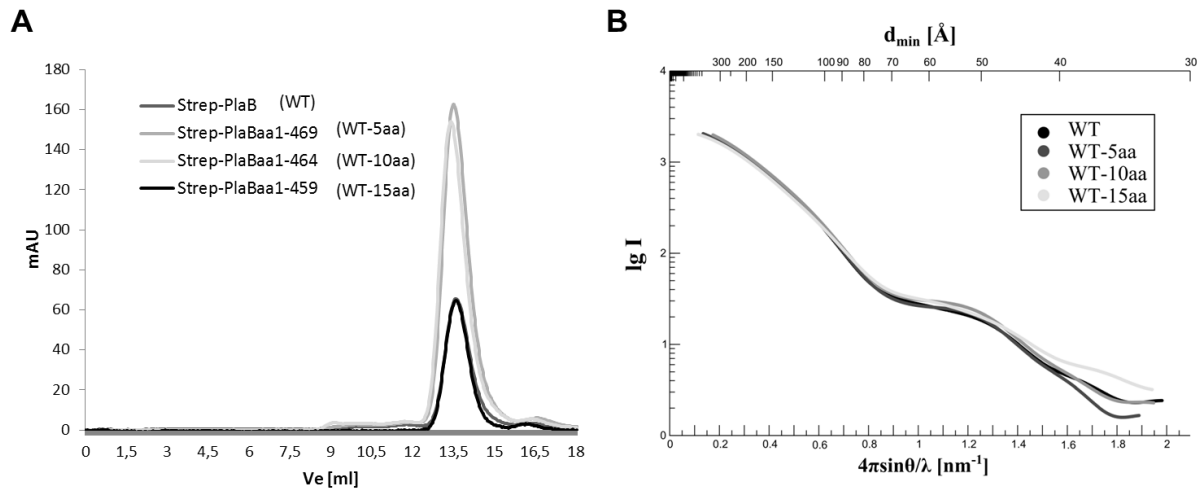


Abb. 3.16: Untersuchungen der C-terminal verkürzten Varianten von Strep-PlaB mittels SEC und SAXS. In *E. coli* BL21(pKK19) exprimierte und gereinigte Strep-PlaB sowie die C-terminal verkürzten Varianten von Strep-PlaB (pKK25-27) wurden auf ihren Oligomerisierungsgrad mittels SEC (A) und SAXS (B) hin getestet. **A)** 0,7 mg/ml (Strep-PlaB, Strep-PlaBaa1-459) bzw. 1 mg/ml (Strep-PlaBaa1-464, Strep-PlaBaa1-469) Protein wurde größenchromatographisch mittels Superdex 200 10/300 GL Säule getrennt. Das Chromatogramm zeigt bei allen vier Strep-Proteinen einen Elutionspeak bei 13,6 ml. **B)** Das Diagramm der normierten Streukurven der SAXS-Messungen von Strep-PlaB und den verkürzten Varianten zeigt die Auftragung des Logarithmus der Streuintensität gegen die Impulsübertragung ($s = 4\pi\sin\theta/\lambda$) und die korrespondierende Auflösung d_{\min} . Bei den niedrigen Werten der Impulsübertragung (links) liegen die Kurven übereinander, was auf eine identische Struktur bei niedriger Auflösung aller Proteine und somit auf einen tetrameren Zustand hindeutet. Abweichungen des Kurvenverlaufs bei höheren Werten (rechts) weisen auf kleine strukturelle Veränderungen bei größerer Auflösung hin.

3.2.4 Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität vom Oligomerisierungsgrad

Bisher zeigte sich, dass das Fehlen der letzten 15 Aminosäuren von PlaB zwar nicht den Oligomerisierungsgrad aber doch die Aktivität beeinflusste. Weiterhin verdeutlichten die AUZ-Analysen, dass der Oligomerisierungsgrad von der Proteinkonzentration abhängt. Da die Bestimmung der enzymatischen Aktivitäten zuerst nur mit einer Proteinkonzentration durchgeführt wurde, konnte abschließend keine Aussage über den Zusammenhang zwischen Proteinkonzentration bzw. Oligomerisierungsgrad und Aktivität getroffen werden. Im Folgenden wurde daher die enzymatische Aktivität des in *E. coli* BL21 exprimierten und gereinigten Strep-PlaB bei unterschiedlichen Enzymkonzentrationen im Bereich von 18,6 μM (1 mg/ml) bis 0,3 nM (0,015 $\mu\text{g/ml}$) ermittelt. Die Abbildung 3.17 A und B stellt den gemessenen Umsatz anhand der Menge FFA pro Zeit und zum anderen die spezifische Aktivität bei den eingesetzten Proteinkonzentrationen der Enzymreaktion mit LPG dar. Es wurde ebenfalls ein Phospholipid als Substrat (PG) getestet, welches ein ähnliches Resultat erzielte (Abb. 3.17 C, D).

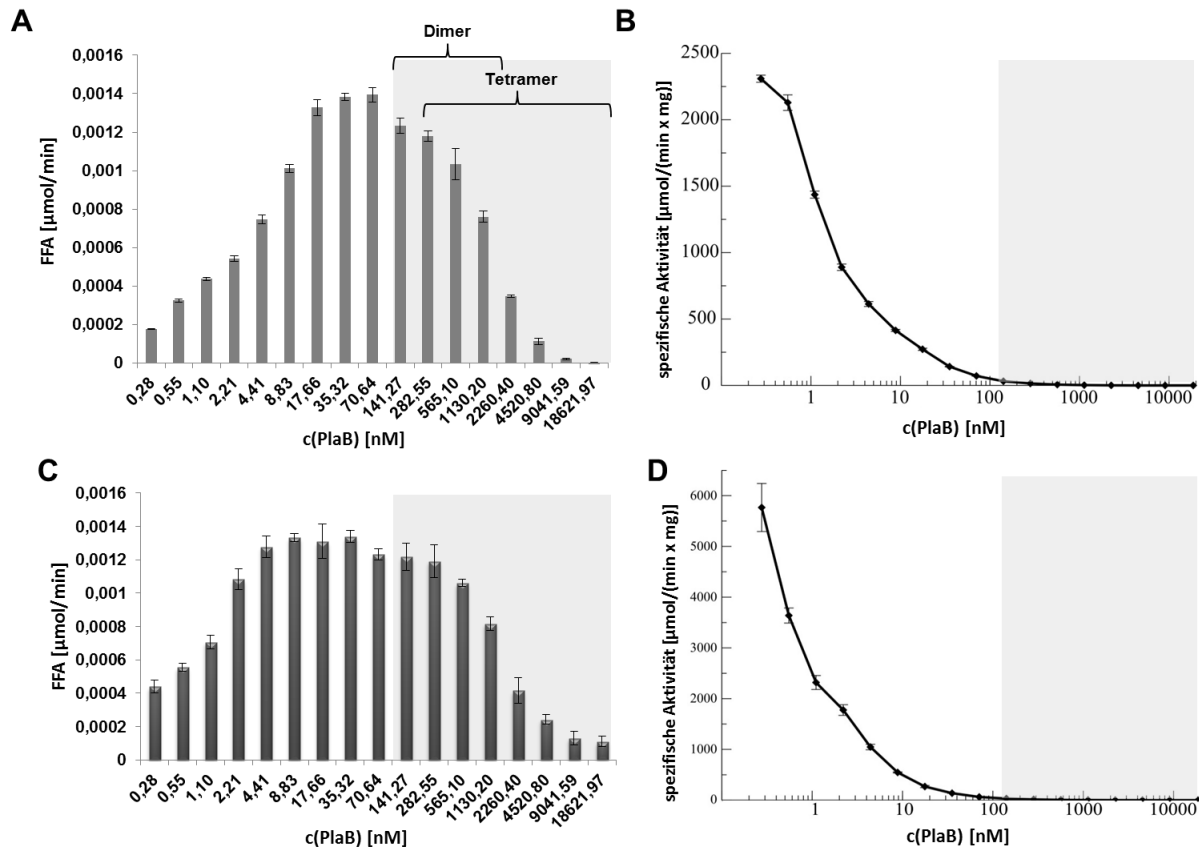


Abb. 3.17: Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität von der Strep-PlaB Proteinkonzentration. Verschiedene Konzentrationen [18,6 μM (1 mg/ml) – 0,0003 μM (0,015 μg/ml)] von in *E. coli* BL21 (pKK19) exprimiertes und gereinigtes Strep-PlaB wurden mit LPG (A, B) bzw. PG (C, D) für 15 min bei 37 °C inkubiert. Zur Analyse der enzymatischen Aktivität wurde die Menge an freigesetzten (FFA) bestimmt. Zum einen ist die Proteinkonzentration gegen die katalytische Aktivität (Menge der FFA pro min) (A, C) und zum anderen gegen die spezifische Aktivität (Menge der FFA pro min und mg) (B, D) aufgetragen. Die grau schattierte Fläche markiert den Proteinkonzentrationsbereich, der mittels der AUZ analysiert wurde. Die Daten sind repräsentativ für Dreifachwerte von drei (A, B). bzw. einem (C) unabhängigen Experimenten

Bei einer Proteinkonzentration von 1 mg/ml (18,6 μM) bis 0,5 mg/ml (9 μM) konnte kein signifikanter Umsatz detektiert werden. Erst bei einer Reduzierung der Proteinkonzentration auf 0,25 mg/ml (4,5 μM) wurden FFA im Reaktionsansatz gemessen. Die katalytische Aktivität zeigt einen glockenförmigen Verlauf, deren Höhepunkt bei ~0,004 mg/ml (0,07 μM) liegt (Abb. 3.17 A). Die aus den Enzymaktivitäten berechneten spezifischen Aktivitäten (katalytische Aktivität bezogen auf die Proteinmenge) zeigten einen sigmoidalen Kurvenverlauf (Abb. 3.17 B). Es wird deutlich, dass mit sinkender Proteinkonzentration die spezifische Aktivität von Strep-PlaB zunimmt (Abb. 3.17 B). Bisher konnte der Oligomerisierungsgrad nur bis zu einer Proteinkonzentration von 0,007 mg/ml (0,13 μM) mittels AUZ ermittelt werden, da bei niedrigeren Konzentrationen das Detektionslimit erreicht war. Im Konzentrationsbereich (> 5,4 μM bzw. 0,3 mg/ml), wo nur das Tetramer mittels AUZ detektiert wurde, zeigte Strep-PlaB keine Aktivität. Im Konzentrationsbereich des Dimers konnte jedoch ein Umsatz detektiert werden

(Abb. 3.17 A). Im Vergleich dazu konnte keine spezifische Aktivität in diesem Bereich verzeichnet werden (Abb. 3.17 B). Die Daten deuten darauf hin, dass der Oligomerisierungsgrad die Aktivität des Enzyms beeinflusst. Die sigmoidale Kurve der spezifischen Aktivität lässt vermuten, dass es im nanomolaren Konzentrationsbereich noch eine dritte Spezies von PlaB geben muss. Da der Kurvenverlauf unterhalb von 8,8 nM (0,49 µg/ml) steil ansteigt, zerfällt das Dimer vermutlich in zwei Monomere, die eine starke Aktivität aufweisen würden. Um diese Vermutung zu adressieren, wurden in Kooperation mit Frau Dr. Curth erneut AUZ-Läufe mit Proteinkonzentrationen im nanomolaren Bereich durchgeführt. Da jedoch das Detektionslimit bei 230 nm erreicht war, wurde das gereinigte Strep-PlaB mit DyLight 488 unspezifisch über Aminogruppen markiert und anschließend mittels SEC gereinigt. Somit konnten Proteinkonzentrationen von 70 nM (0,004 mg/ml) bis 0,3 nM (0,015 µg/ml) über Fluoreszenzmessungen im Anregungsbereich von 488 nm analysiert werden. Es wurden ebenfalls höhere Konzentrationen von 565 nM (0,03 mg/ml) bis 141 nM (0,008 mg/ml) mitgeführt, um das Verhalten des markierten Proteins mit dem unmarkierten zu vergleichen. Den gemessenen Ansätzen wurde je 1 µM BSA als Füllprotein zugegeben, um Verluste von Strep-PlaB durch Anheftung an der Gefäßwandung zu vermeiden.

Die Auswertung mit dem Programm SedFit zeigte, dass sich bei den höheren Konzentrationen des markierten Strep-PlaB Proteins ein Dimer-Tetramer-Gleichgewicht einstellte, wie es bereits bei dem unmarkierten PlaB beobachtet worden war (Abb. 3.18 A, vergleiche Abb. 3.14 B). Die $s_{20,w}$ -Werte sind allerdings etwas höher (10,0 S für das Tetramer und 6,2 S für das Dimer), was vermutlich auf die Markierung zurückzuführen ist. Bei den niedrigeren Konzentrationen trat eine weitere Spezies mit ~4,4 S auf, welche dem Monomer zuzuordnen ist (Abb. 3.18 B). Der Anteil des vermuteten Monomers nimmt mit sinkender Proteinkonzentration zu. Entsprechend reduzierte sich der Anteil des PlaB-Dimers. Es sollte erwähnt werden, dass das verwendete BSA ebenfalls bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm fluoresziert, was in einem positiven Signal bei ~4 S resultiert und auf fluoreszierende Verunreinigung im BSA schließen lässt. Jedoch ist die Fläche dieses Kontrollsignals (BSA mit Puffer) kleiner als die des Signals von BSA mit Strep-PlaB, sodass die gebildete Differenz dem monomeren Anteil von Strep-PlaB zuzuordnen wäre (Abb. 3.18 B).

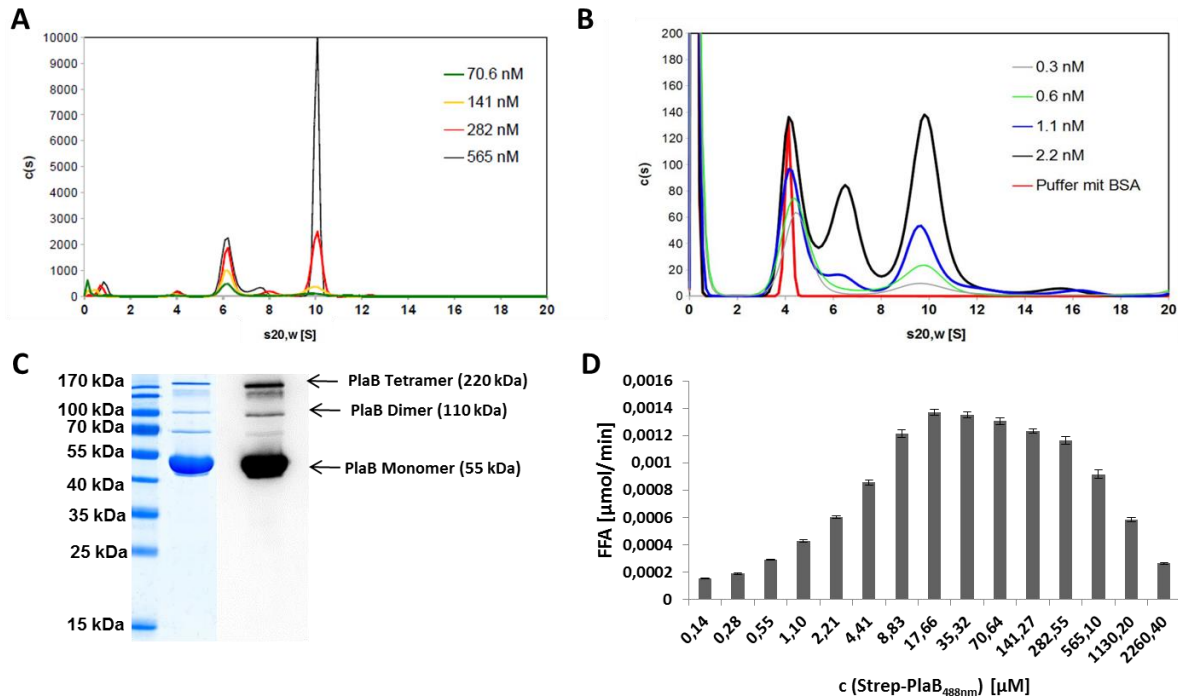


Abb. 3.18: Analytische Ultrazentrifugation (AUZ) zur Bestimmung der Oligomerisierungszustände im nanomolaren Konzentrationsbereich von PlaB. Die AUZ-Analyse wurde mit in *E. coli* BL21 (pKK19) exprimiertem und gereinigtem Strep-PlaB durchgeführt. Das Protein wurde zusätzlich mit DyLight 488 markiert und anschließend mittels SEC gereinigt. **A)** Die $c(s)$ -Verteilung höherer Konzentrationen von markiertem Strep-PlaB [565 nM - 70,6 nM] zeigte die Ausbildung des bekannten Dimer-Tetramer-Gleichgewichtes, wobei das Tetramer mit 10 S und das Dimer mit 6,2 S sedimentierte. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm. **B)** Die $c(s)$ -Verteilung bei niedrigeren Proteinkonzentrationen von markiertem Strep-PlaB [2,2 nM - 0,3 nM]. Es konnte eine dritte Proteinspezies bei ~4,4 S detektiert werden. **C)** Das markierte Protein wurde mittels SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung und α -PlaB Western Blot analysiert. Dazu wurden von der SEC-gereinigten Fraktion 15 bzw. 10 μ l (7,97 μ M) verwendet. **D)** Verschiedene Konzentrationen [2,28 μ M – 0,13 nM] von mit DyLight markiertem Strep-PlaB wurden mit LPG für 15 min bei 37 °C inkubiert. Zur Analyse der enzymatischen Aktivität wurde die Menge an freigesetzten Fettsäuren (FFA) bestimmt und die daraus resultierende katalytische Aktivität. Die Daten (D) sind repräsentativ für Dreifachwerte von zwei unabhängigen Experimenten.

Im Vergleich zu den unmarkierten Ansätzen zeigte die Untersuchung mit dem markierten Strep-PlaB ein verändertes Verhältnis zwischen Monomer, Dimer und Tetramer. Der Tetrameranteil war bei höheren Konzentrationen von markiertem Strep-PlaB (565 nM - 141 nM) ungewöhnlich stark ausgeprägt. Eine Western Blot Analyse mit markierten Strep-PlaB (7,97 μ M; 0,4 mg/ml) zeigte neben dem Signal bei 55 kDa zwei weitere schwache Banden im Bereich von 110 kDa und oberhalb von 170 kDa, die dem Dimer- und Tetramerezustand von PlaB zuzuordnen sind (Abb. 3.18 C). Möglicherweise verursacht die Markierung der Lysinreste bzw. der Aminogruppen eine kovalente Verknüpfung von Monomeren bei einem geringen Anteil des Proteins. Die enzymatische Aktivität des markierten Strep-PlaB wurde ebenfalls überprüft und zeigte ein vergleichbares Verhalten wie das unmarkierte Protein (Abb. 3.18 D).

Zusammenfassend belegten diese Daten das Auftreten des Monomers im nanomolaren Bereich. Es stellte sich somit heraus, dass PlaB ein konzentrationsabhängiges Monomer-Dimer-Tetramer-Gleichgewicht ausbildet. Da im Konzentrationsbereich, in dem überwiegend die tetramere Form auftrat, keine signifikante spezifische Aktivität verzeichnet werden konnte, ist dieser oligomere Zustand vermutlich nicht die aktive Form von PlaB. Aufgrund des starken Anstiegs der spezifischen Aktivität unterhalb einer Proteinkonzentration von 8,8 nM (0,49 µg/ml) und durch das Auftreten der monomeren Form in diesem Bereich, ist anscheinend nicht das Dimer, sondern das Monomer die aktive Form des Enzyms.

3.3 Expressionsprofil mit dazugehörigen lipolytischen Aktivitäten von PlaB

Der in der Einführung erwähnte charakteristische biphasische Lebenszyklus von *Legionella* tritt sowohl bei intrazellulärem Wachstum als auch in BYE-Flüssigmedium auf. Dabei entspricht dem exponentiellen Wachstum die replikative Phase und der stationären Wachstumsphase die transmissive Phase. Frühere Ergebnisse zeigten, dass die *plaB* mRNA hauptsächlich in der replikativen Phase exprimiert wird und die Transkriptmenge von der spät-exponentiellen Phase bis hin zur stationären Phase wieder abnimmt (Schunder *et al.*, 2010). Die in diesem Zusammenhang ebenfalls untersuchte enzymatische PC-abhängige PLA-Aktivität stieg während der exponentiellen Wachstumsphase an und sank in der stationären Phase wieder (Schunder *et al.*, 2010). Da im Rahmen dieser Arbeit ein funktioneller α -PlaB Antikörper generiert wurde, sollte im Weiteren das Proteinlevel von PlaB während des *L. pneumophila* Wachstums unter Laborbedingungen untersucht werden. Dazu wurde *L. pneumophila* Corby Wildtyp Kultur in BYE-Flüssigmedium angezogen. Aus der frühen exponentiellen, mittleren exponentiellen, späten exponentiellen und stationären Phase wurden Kulturproben mit gleicher OD₆₆₀ entnommen, mittels α -PlaB Western Blot analysiert und auf enzymatische Aktivität hin getestet. In Abbildung 3.19 A wird deutlich, dass PlaB in geringen Mengen während der exponentiellen Phase exprimiert wurde. Die Konzentration stieg bis zur stationären Phase (ab 24 h) an und blieb innerhalb dieser Wachstumsphase (bis 72 h) konstant (Abb. 3.19 A). Die Menge des konstitutiv exprimierten *major outer membrane proteins* MOMP (Weissenmayer *et al.*, 2011) stieg hingegen nicht an (Abb. 3.19 A). Als interne Ladekontrolle wurde eine 40 kDa Bande eines unbekannten, aber gleichmäßig abundant auftretenden Proteins mittels Ponceau S-Lösung angefärbt. Interessanterweise hatte die PC-abhängige PLA-Aktivität ihren Höhepunkt in der mittleren exponentiellen Phase und sank danach wieder (Abb. 3.19 B), was mit früheren Resultaten korreliert (Schunder *et al.*, 2010), wohingegen die PG-abhängige PLA-Aktivität bis zur stationären Phase anstieg und dort stagnierte (Abb. 3.19 B). Die LPLA-Aktivitäten gingen mit den korrespondierenden PLA-Aktivitäten einher. So stieg die LPG-abhängige LPLA-Aktivität bis zur

stationären Phase an und blieb in dieser Phase annähernd gleich, wohingegen die LPC-abhängige LPLA-Aktivität ihren Höhepunkt in der mittleren exponentiellen Phase hatte und dann leicht abfiel (Abb. 3.19 B).

Die Ergebnisse zeigten, dass PlaB unterschiedliche Profile der enzymatischen Aktivität in den unterschiedlichen Wachstumsphasen besitzt. Interessanterweise wurde PlaB erst in größeren Mengen während der späteren Wachstumsphase, der stationären Phase, detektiert, obwohl das Transkript hauptsächlich in der exponentiellen Phase aufgetreten war (Schunder *et al.*, 2010).

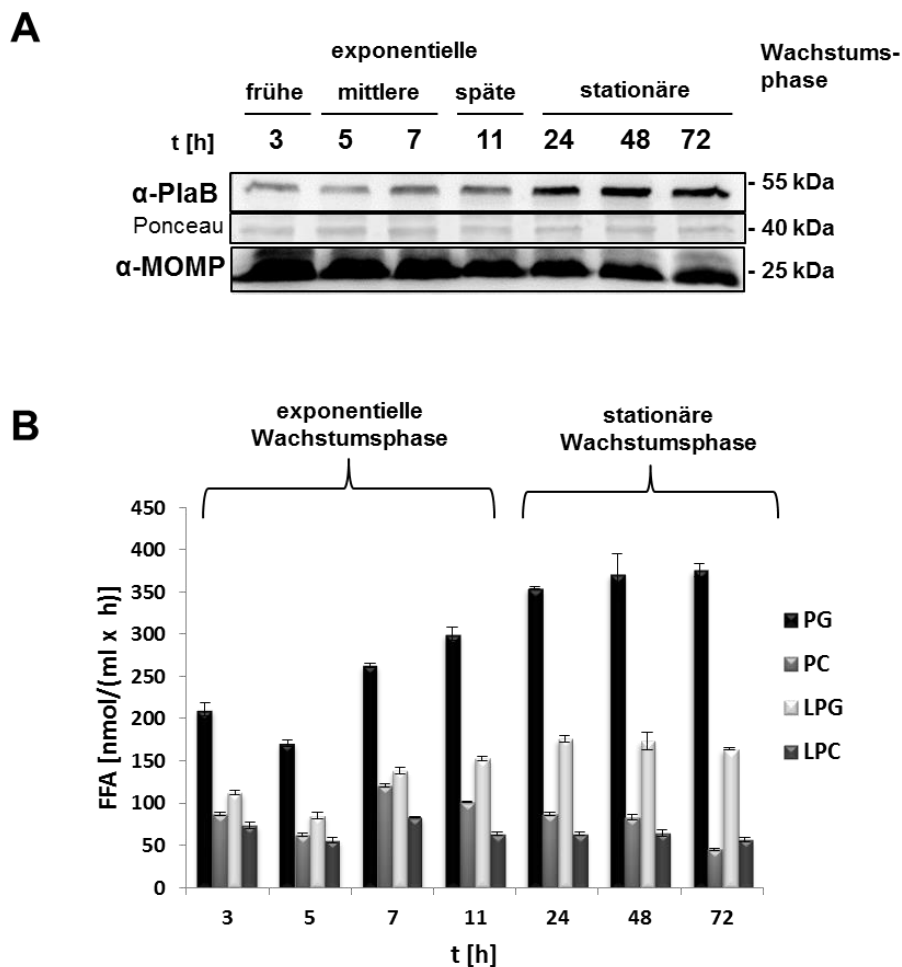


Abb. 3.19: Präsenz von PlaB während des Wachstums von *L. pneumophila* Corby Wildtyp. *L. pneumophila* Corby Wildtyp Kultur wurde in BYE angezogen und mittels α -PlaB Western Blot und Lipidhydrolyse analysiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde je ein Aliquot entnommen und mit BYE auf eine $OD_{660} = 2.0$ eingestellt. **A)** Für die Western Blot Analyse wurden je 30 μ l Zelllysate eingesetzt. Die Expression von PlaB in den verschiedenen Wachstumsphasen (3 h = frühe exponentielle Phase, $OD_{660} = 0.6$; 5-7 h = mittlere exponentielle Phase, $OD_{660} = 1.0-1.5$; 11 h = späte exponentielle Phase, $OD_{660} = 1.8-1.9$ 24-72 h = 1.9-2.0 stationäre Phase) wurde mittels α -PlaB Western Blot überprüft. Die Detektion von MOMP mittels des α -MOMP Antikörpers und die Ponceau-gefärbte Bande dienten als interne Ladekontrolle. **B)** Die *L. pneumophila* Corby Wildtyp Zelllysate wurden 1:50 verdünnt mit verschiedenen Phospholipiden (s. Tab. 2.7) bei 37 °C für 3 h inkubiert und die Freisetzung der freien Fettsäuren (FFA) bestimmt. Die Daten sind repräsentativ für Dreifachwerte von drei unabhängigen Experimenten.

In diesem Zusammenhang war es ebenfalls interessant zu untersuchen, wie hoch die Konzentration von PlaB pro Zelle in der späten exponentiellen/Anfang der stationären Phase ist. Dazu wurde eine *L. pneumophila* Wildtyp Kultur bis $OD_{660} \sim 1.9$ angezogen. Zur Bestimmung der kolonieformenden Einheiten (CFU) pro ml wurde die Kultur mit einer Verdünnung von 10^{-7} ausplattiert. Die Auswertung ergab einen Wert von $2,92 \times 10^{11}$ CFU/ml. Eine anschließende α -PlaB Western Blot Analyse der *Legionella*-Kultur und dem gereinigten Strep-PlaB als Vergleichswert ermöglichte die Berechnung der Proteinmenge (s. Abb. 3.20). Mit dem Programm *ImageJ* wurden zunächst die Intensitäten der Signale von gereinigtem Strep-PlaB und die des Wildtyp Zelllysates ermittelt. Ein anschließender Vergleich zu der bekannten eingesetzten Proteinmenge von Strep-PlaB ergab eine PlaB-Menge von $5,7 \times 10^{-12}$ μ g bzw. 64 Monomeren pro Zelle. Literaturangaben zufolge haben Legionellen in etwa einen Durchmesser von $\sim 0,5$ μ m und eine Länge von $\sim 1,5$ μ m (Faulkner & Garduño, 2013). Mit diesen Größenverhältnissen würde PlaB in einer errechneten Konzentration von $0,35$ μ M pro Zelle und damit nach den Ergebnissen der AUZ als ein Gemisch aus Dimer und Tetramer vorkommen. Es ist anzumerken, dass diese Methode nur semiquantitativ ist und eine obere Abschätzung ermöglicht, da das Verhältnis zwischen Proteinmenge und Signalintensität nicht linear ist.

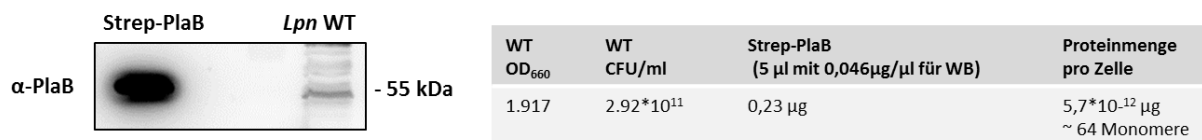


Abb. 3.20: Konzentrationsbestimmung von PlaB pro *Legionella*-Zelle. Eine *L. pneumophila* (*Lpn*) Corby Wildtyp (WT) Kultur wurde bis zu einer OD_{660} von ~ 1.9 kultiviert. Die Bestimmung der kolonieformenden Einheiten (CFU) erfolgte mittels Acolyte. Mit Hilfe eines α -PlaB Western Blots und einer densitometrischen Analyse der Signalstärke (mittels *ImageJ*) wurde die Konzentration von PlaB im WT bestimmt. Als Standard diente aus *E. coli* BL21 gereinigtes Strep-PlaB.

3.4 Untersuchungen zur Lokalisation von PlaB

PlaB wurde bereits in der Vergangenheit als stärkste zellassoziierte PLA-Aktivität in *Legionella* charakterisiert (Flieger *et al.*, 2004). Weiterführende Studien zur Lokalisation konnten das Protein nur anhand der enzymatischen Aktivität der äußeren Membran des Bakteriums zuordnen, da bis dato noch kein funktionierender α -PlaB Antikörper zur Verfügung stand (Schunder *et al.*, 2010). Im Rahmen dieser Arbeit war es nun möglich, Lokalisationsexperimente mittels immunologischer Proteindetektion durchzuführen. Da das Protein verstärkt in der späteren Wachstumsphase detektiert werden konnte (s. 3.3), wurden für diese Analysen *L. pneumophila* Corby Flüssigkulturen mit einer OD₆₆₀ ~1.9 geerntet. Die anschließend durchgeführte Fraktionierung des Zelllysates mittels Ultrazentrifugation wurde mit Hilfe des α -PlaB Antikörpers im Western Blot analysiert. Eine erste Trennung der zytosolischen von der Membranfraktion zeigte, dass PlaB überwiegend in der pelletierten Membranfraktion detektiert wurde (Abb. 3.21 A). Als Kontrollproteine wurden ebenfalls das äußere Membranprotein MOMP (Krinos *et al.*, 1999, Gabay *et al.*, 1985, Vranckx *et al.*, 2007) und das zytosolische Chaperon DnaK (Vranckx *et al.*, 2007, Amemura-Maekawa & Watanabe, 1997) mittels spezifischer Antikörper im Western Blot detektiert. Diese Markerproteine bestätigten die Trennung der zytosolischen von der Membranfraktion, da der α -MOMP Antikörper ein deutliches Signal in der pelletierten Fraktion (P) zeigte und im Fall von DnaK ein Signal in der Überstandsfraktion (ÜS) erhalten wurde (Abb. 3.21 A). Wie zu erwarten war, konnten alle drei Proteine im Ausgangslysat (L) nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde der Kulturüberstand mittels α -PlaB Western Blot überprüft, wobei kein Signal detektiert wurde (Daten nicht gezeigt). Die Fraktionen wurden im Anschluss auf enzymatische Aktivität getestet, um das Vorkommen von PlaB zu bestätigen. In Abbildung 3.21 B wird ersichtlich, dass alle drei Fraktionen sowohl PLA- als auch LPLA-Aktivität aufwiesen. Im Vergleich zur zytosolischen Fraktion (ÜS) wurde eine größere Menge an FFA in der Membranfraktion (P) detektiert, was mit der Menge an PlaB im Western Blot korrelierte (Abb. 3.21 A und B). Um in Erfahrung zu bringen, ob das PlaB-Protein an der äußeren Membran lokalisiert ist, wurde ein zweiter Ultrazentrifugationsschritt durchgeführt. Für die zweite Trennung wurde mit dem Zelllysate der *L. pneumophila* Corby *plaB1* (pJB04) Komplementante gearbeitet, da beim Wildtyp die Signale im α -PlaB Western Blot nicht ausreichend detektierbar waren. Vor dem zweiten Ultrazentrifugationsschritt wurde das Membranpellet in mit 2% Triton X-100 versetztem HEPES-Puffer resuspendiert. Triton X-100 ist ein nichtionisches Detergenz, welches zur Lösung von Proteinen der inneren Membran Gram-negativer Bakterien und somit zur Trennung von Proteinen der äußeren und inneren Membran eingesetzt wird (Roy & Isberg, 1997). Die Western Blot Analyse in Abbildung 3.21 C verdeutlicht, dass PlaB sowohl in der Triton-löslichen (IM = innere Membranfraktion) als auch in der Triton-unlöslichen Fraktion (OM =

äußere Membranfraktion) vorkam, wohingegen MOMP in der OM und LepB, eine Signalpeptidase der inneren Membran (De Buck *et al.*, 2008, Lammertyn *et al.*, 2004, Vranckx *et al.*, 2007), in der IM detektiert wurde. DnaK konnte, wie bereits gezeigt, in der zytosolischen Fraktion nachgewiesen werden (Abb. 3.21 A und C). Darüber hinaus konnte ein starkes PlaB-Signal in der ÜS-Fraktion der Komplementante festgestellt werden.

Die Ergebnisse der zellulären Fraktionierungsexperimente bestätigten die früheren Aktivitätsdaten zur Lokalisation, in denen PlaB als ein membranassoziiertes Protein beschrieben wurde (Schunder *et al.*, 2010). Die Trennung der äußeren von der inneren Membran zeigte jedoch, dass PlaB in beiden Kompartimenten detektiert werden konnte, was durch die Überexpression von PlaB bedingt sein könnte. Dies ist gegensätzlich zu früheren Aktivitätsstudien, bei welchen PlaB nur in der Fraktion der äußeren Membran gefunden wurde (Schunder *et al.*, 2010).

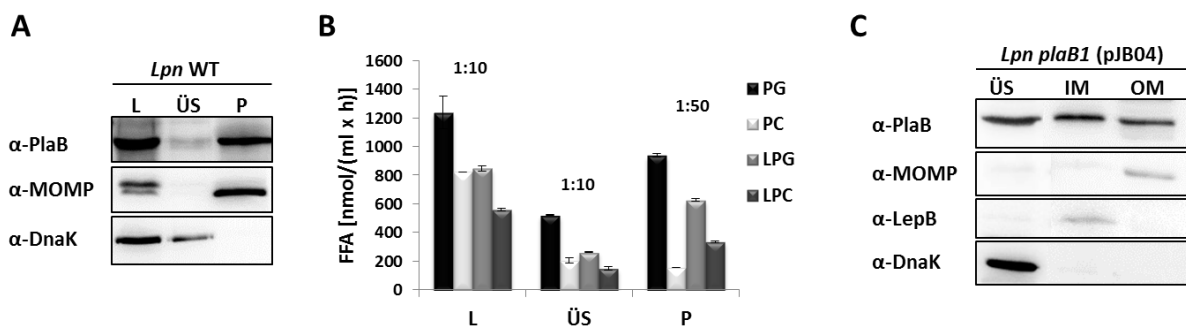


Abb. 3.21: Lokalisationsanalyse von PlaB mittels Ultrazentrifugation. **A)** Das *L. pneumophila* Corby Wildtyp (WT) Zelllysate (L) wurde mittels Ultrazentrifugation in zytosolische (ÜS) und Membranfraktion (P) getrennt. 20 µl jeder Fraktion wurden mittels Western Blot gegen PlaB, MOMP und DnaK untersucht. **B)** Die *L. pneumophila* Corby WT Fraktionen wurden in den angegebenen Verdünnungen mit verschiedenen Phospholipiden (siehe Tab. 2.7) bei 37 °C für 1 h inkubiert und die Freisetzung der freien Fettsäuren (FFA) bestimmt. **C)** Die membranassoziierte Fraktion der *plaB* exprimierenden *L. pneumophila* Corby *plaB1* (pJB04) Komplementante wurde mittels eines zweiten Ultrazentrifugationsschrittes in eine Triton X-100-lösliche (IM = Proteine der inneren Membran) und unlösliche Fraktion (OM = Proteine der äußeren Membran) getrennt. Western Blot Analysen von je 20 µl pro Fraktion erfolgten mittels α-PlaB, α-DnaK (zytosolischer Marker), α-LepB (Markerprotein der inneren Membran) und α-MOMP (Markerprotein der äußeren Membran). Die Daten sind repräsentativ für zwei (B, C) bzw. drei unabhängige Experimente (A).

Um diese Beobachtungen zu verifizieren wurden weitere Experimente zur Lokalisation von PlaB durchgeführt. Dazu wurden zelloberflächenassoziierte Proteine von intakten *L. pneumophila* Corby Wildtypzellen mittels des Biotinylierungsreagenzes Sulfo-NHS-SS-biotin markiert. Dieses wasserlösliche Reagenz eignete sich besonders gut, da die Sulfonatgruppe von Sulfo-NHS-SS-biotin die Permeation durch die äußere Membran verhindert. Die kovalente Bindung des Biotins an die zugänglichen Proteine auf der Zelloberfläche ermöglicht so die Isolierung markierter

Proteine aus den anschließend aufgeschlossenen Zellen über eine Neutravidin-konjugierte Agarose. Als spezifische Kontrollen wurden *L. pneumophila* Corby Wildtypzellen ohne Biotinylierungsreaktion und *L. pneumophila* Corby *plaB1* Mutantenzellen mitgeführt. Die anschließende Analyse der Zelllysate (L) und der Neutravidin-Agarose (B) mittels Western Blot zeigte ein schwaches Signal der B-Fraktion mit dem α -PlaB Antikörper im Fall der Wildtypzellen, wohingegen bei den Wildtypzellen ohne Biotinylierungsreaktion und bei der *plaB*-Mutante kein Signal erschien (Abb. 3.22). Das integrale Protein der äußeren Membran MOMP konnte ebenfalls in der B-Fraktion nach erfolgter Biotinylierungsreaktion detektiert werden (Abb. 3.22). Im Gegensatz dazu waren das Protein der inneren Membran LepB und das zytosolische Protein DnaK nicht für das Biotinylierungsreagenz zugänglich, da im Western Blot mit den spezifischen Antikörpern kein Signal in der B-Fraktion detektiert wurde (Abb. 3.22). Alle Proteine konnten im kruden Zelllysate detektiert werden. Diese Analyse zeigte, dass PlaB und MOMP für Sulfo-NHS-SS-biotin zugänglich waren und sich somit exponiert auf der Bakterienzelle befinden müssten.

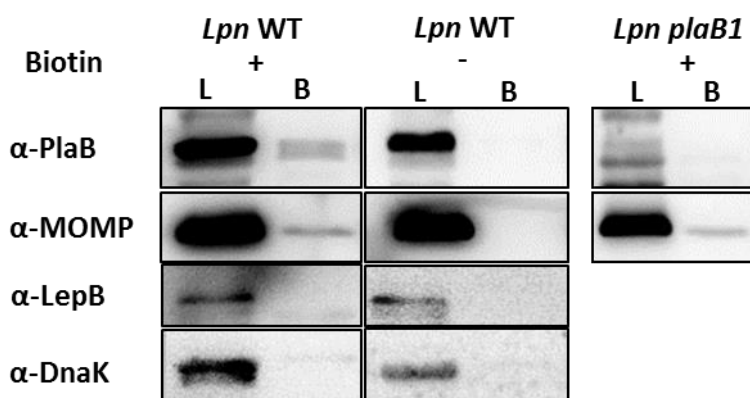


Abb. 3.22: Lokalisationsanalyse von PlaB mittels Biotinylierung oberflächenassoziierter Proteine. Intakte Zellen von *L. pneumophila* Wildtyp und *plaB*-Mutante wurden mit Sulfo-NHS-SS-biotin markiert. Die Biotin-markierten Proteine der Zelllysate wurden mittels Neutravidin-konjugierter Agarose isoliert. 20 μ l der jeweiligen Zelllysate (L) und der Neutravidin-Agarose-Fraktion (B) wurden mittels α -PlaB, α -MOMP, α -LepB und α -DnaK Western Blot analysiert. *L. pneumophila* Wildtypzellen (*Lpn* WT), welche nicht mit dem Biotinylierungsreagenz inkubiert wurden, dienten als Kontrolle. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Weiterhin wurde die Zugänglichkeit von PlaB für eine von außen zugesetzte Protease überprüft. Als Protease eignete sich Proteinase K, da diese Serinprotease Peptidbindungen sowohl am Ende als auch im Inneren von Proteinen angreift. *L. pneumophila* Corby Wildtypzellen und Zellen der Komplementante wurden aus der späten exponentiellen/Anfang stationäre Phase mit Proteinase K für den angegebenen Zeitraum von 0 bis 90 min bei 37 °C inkubiert. Zur Kontrolle der Vitalität der Zellen wurde je ein Aliquot vor der Proteinase K-Zugabe und nach 90-minütiger Inkubation mit der Protease für eine Lebend/Tod-Färbung entnommen. Mit der mikroskopischen

Untersuchung der Bakterienzellen sollte belegt werden, dass ein Großteil der Bakterienzellen intakt blieb, sodass die Protease ihre Aktivität nur gegen oberflächenassoziierte Proteine richten konnte. Die anschließende Inaktivierung der Protease mit PMSF sollte verhindern, dass Proteinase K nach der Lyse der Zellen Proteine des Zytosols und der inneren Membran verdaut.

Eine quantitative Auswertung der mikroskopischen Analyse zeigte, dass im Durchschnitt 91% der Wildtypzellen bzw. 95% der Komplementantenzellen vor der Inkubation mit Proteinase K (0 min) und 86% der Wildtypzellen bzw. 88% der Komplementantenzellen nach 90-minütiger Inkubation mit Proteinase K grün fluoreszierten. Anhand der Abbildung 3.23 A wird beispielhaft ersichtlich, dass der größte Teil der Zellen grün fluoreszierte, was auf intakte Membranen dieser Bakterien hinwies. Die Western Blot Analyse in Abbildung 3.23 B zeigt, dass mit zunehmender Inkubationsdauer der *L.pneumophila* Wildtyp- und Komplementantenzellen mit Proteinase K die Signalstärke für PlaB abnahm. Die Quantifizierung der α -PlaB Western Blot Banden bestätigte diese Beobachtung. Im Fall der Wildtypzellen nahm die Intensität schon nach 30 min um 75% und im Fall der Komplementante um 70% ab und blieb dann bis 90 min konstant (Abb. 3.23 B). Im Gegensatz dazu blieben die Signalstärken von DnaK und LepB im Western Blot relativ konstant, was sich ebenfalls in der Quantifizierung widerspiegelte. Die Bandenstärke des integralen MOMP-Proteins der äußeren Membran änderte sich nur geringfügig (Abb. 3.23 B). Diese Beobachtungen zeigten, dass nur PlaB für die Proteinase K zugänglich war, jedoch nicht LepB oder DnaK.

Zusammenfassend deuten die Daten der Lokalisationsstudien darauf hin, dass PlaB hauptsächlich auf der Oberfläche der äußeren Membran von *L. pneumophila* vorkommt, da PlaB sowohl für Proteinase K als auch für das Biotinylierungsreagenz zugänglich war. Dagegen war MOMP, ein integrales Protein der äußeren Membran, hauptsächlich für die Biotinylierung zugänglich. Wiederum konnten das zytosolische Chaperon DnaK und LepB, ein Protein der inneren Membran, weder biotinyliert noch mittels Proteinase K verdaut werden.

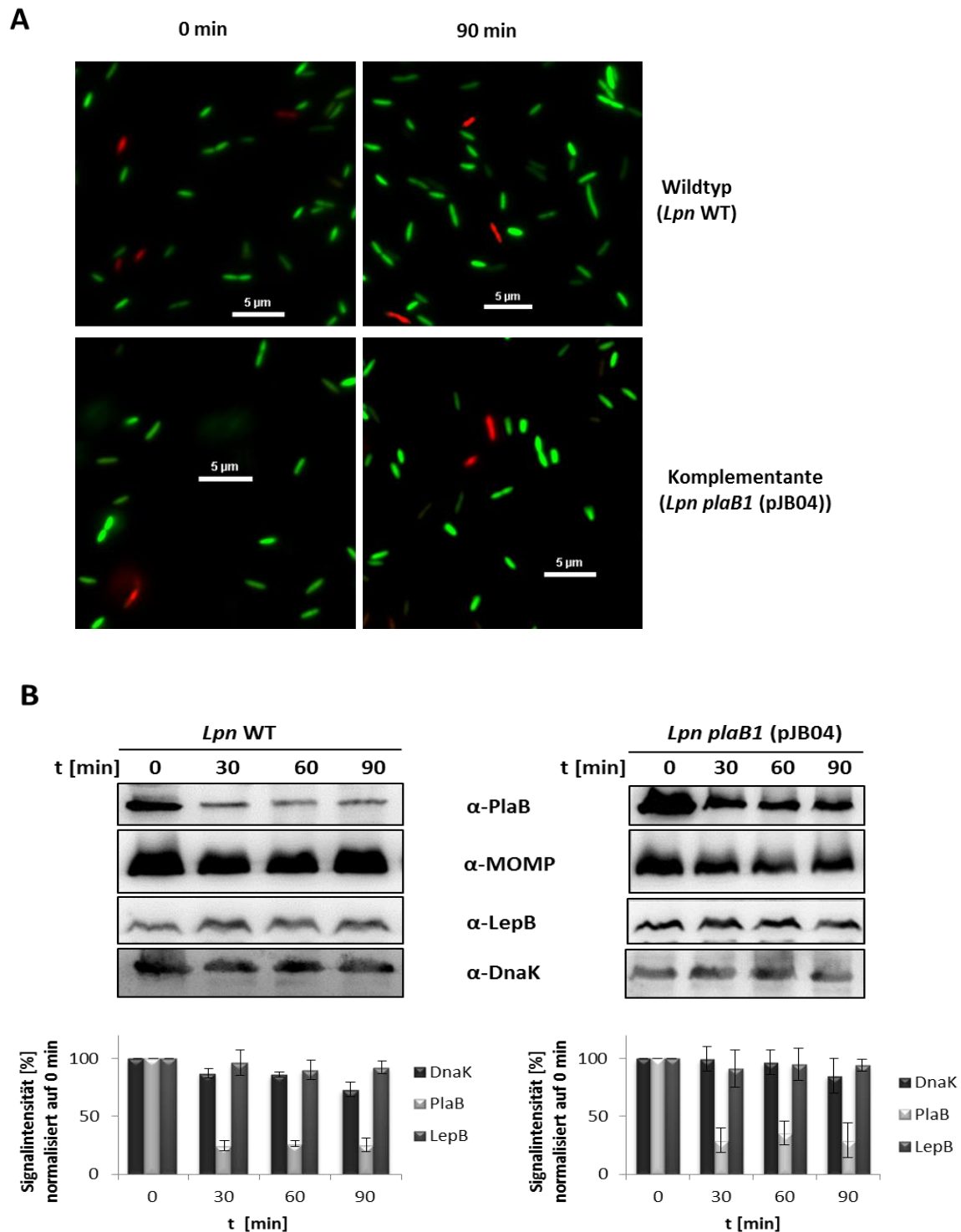


Abb. 3.23: Lokalisationsanalyse von PlaB mittels Proteinase K-Degradation. Intakte Zellen von *L. pneumophila* Corby Wildtyp (*Lpn* WT) und *L. pneumophila* Corby *plaB1* (pJB04) Komplementante (*Lpn* *plaB1* (pJB04)) wurden mit Proteinase K bei 37 °C für 0 bis 90 min inkubiert und anschließend mittels PMSF behandelt. **A**) Mikroskopische Aufnahme einer Lebend/Tod-Färbung von *L. pneumophila* Corby Wildtyp und *L. pneumophila* Corby *plaB1* (pJB04) Komplementante vor der Proteinase K-Zugabe und nach 90-minütiger Inkubation. Als Zeichen für vitale Zellen fluoresziert das Syto 9 Reagenz grün, nachdem es passiv die Membran penetriert und an die DNA bindet. Das nicht membrangängige, rot fluoreszierende Propidiumiodid penetriert nur über beschädigte Membranen und bindet dann an DNA, was als Anzeichen für tote Zellen gewertet wird. **B**) In Western Blot Analysen wurden je 20 µl Zellsuspension mittels α-PlaB, α-MOMP, α-LepB und α-DnaK Antikörper untersucht. Die Signale von LepB, PlaB und DnaK wurden zusätzlich mit dem Programm ImageJ quantifiziert (<http://rsb.info.nih.gov/ij>). Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente, wobei die Quantifizierung die drei Experimente mittelt.

3.5 Untersuchungen zur Sekretion von PlaB

Die in Abschnitt 3.4 beschriebenen Ergebnisse zur Lokalisation deuten darauf hin, dass das PlaB-Protein exponiert auf der Oberfläche von *L. pneumophila* vorkommt. Im Folgenden stellte sich die Frage, wie das Protein sekretiert wird. Für *Legionella* sind bisher die putativen Sekretionssysteme vom Typ I (Lss), Typ IVA (Lvh, Trb-1, Trb-2) und Typ V (Autotransporter) sowie die zwei Sekretionsmaschinerien vom Typ II (Lsp) und Typ IVB (Dot/Icm) bekannt. Bisherige Studien zu diesem Thema konnten wiederum nur über die enzymatische Aktivität getesteter Sekretionsmutanten die Sekretionswege vom Typ I, II, IVB und das Tat-Sekretionssystem für PlaB ausschließen (Schunder *et al.*, 2010). Zudem wurde kein putatives Signalpeptid für PlaB vorhergesagt (s. 3.1.1). Im Rahmen dieser Arbeit sollten die bisherigen Erkenntnisse mittels des spezifischen α -PlaB Antikörpers verifiziert werden.

3.5.1 Analyse verschiedener Sekretionsmutanten von *L. pneumophila*

Zunächst wurden die zur Verfügung stehenden Sekretionsmutanten mittels des Proteinase K-Verdaus untersucht, welcher für die Lokalisationsstudien etabliert wurde. Dazu wurden *L. pneumophila* Corby und JR32 Wildtypzellen sowie Zellen der *tatC*, *lssB* (T1SS), *lspDE* (T2SS), *lvh* (T4ASS), *dotA* (T4BSS), *dotB* (T4BSS), *dotB/lvh* (T4A/BSS) Sekretionsmutanten aus der späteren Wachstumsphase ($OD_{660} \sim 1.9$) mit Proteinase K für 60 min bei 37 °C inkubiert und das Enzym anschließend mit PMSF inaktiviert. Anschließend wurden die Zellen mittels α -PlaB Western Blot analysiert. Die Detektion von LepB und DnaK diente als interne Kontrolle.

In Abbildung 3.24 wird ersichtlich, dass bei allen Sekretionsmutanten nach 60-minütiger Inkubationszeit mit Proteinase K das PlaB-Signal deutlich abnahm. Im Vergleich dazu blieben die Signale der 0- und 60-minütigen Inkubationszeit für LepB und DnaK gleich stark.

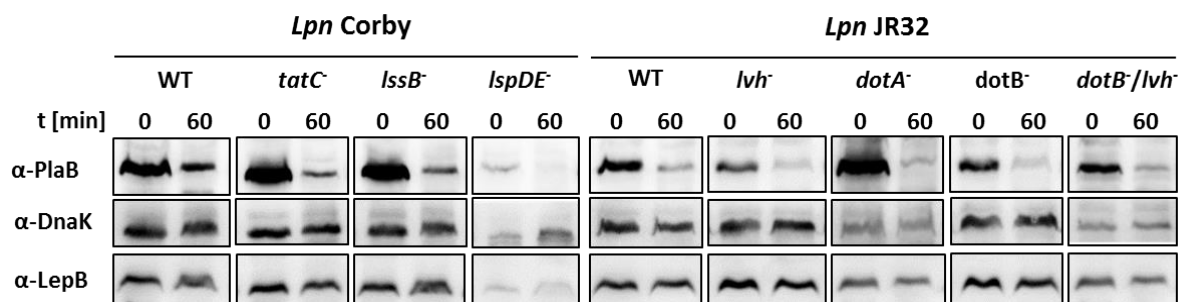


Abb. 3.24: Sekretionsanalyse von PlaB mittels Proteinase K-Degradation bei verschiedenen Sekretionsmutanten. Intakte Zellen von *L. pneumophila* Corby Wildtyp (*Lpn* Corby WT) und den isogenen Sekretionsmutanten *tatC*, *lssB* (T1SS), *lspDE* (T2SS) sowie von *L. pneumophila* JR32 Wildtyp (*Lpn* JR32 WT) und den isogenen Sekretionsmutanten *lvh* (T4ASS), *dotA* (T4BSS), *dotB* (T4BSS), *dotB/lvh* (T4A/BSS) wurden auf ihre Zugänglichkeit für Proteinase K getestet. Es wurden je 20 μ l Zellsuspension vor (0 min) bzw. nach der 60-minütigen Inkubation mit Proteinase K bei 37 °C und anschließender PMSF-Inaktivierung mittels α -PlaB Western Blot analysiert. Als Kontrollen wurden LepB und DnaK mitgeführt. Die Daten sind repräsentativ für mindestens zwei unabhängig durchgeführte Experimente.

Im Vergleich zu den anderen Stämmen fällt jedoch auf, dass die Signale im Fall der *lspDE*-Mutante sehr schwach waren. Aufgrund dieser Beobachtung wurde das Zelllysate der Typ II-Sekretionsmutante näher untersucht. Zunächst wurde eine Flüssigkultur der *lspDE*-Mutante bis zu einer optischen Dichte von $OD_{660} \sim 1.9$ angezogen und im Anschluss je 2 Fraktionen geerntet. Ein Pellet wurde unmittelbar in SDS-Probenpuffer bei 95 °C für 10 min inkubiert. Das zweite Pellet wurde in mit Lysozym versetztem Tris-Puffer lysiert. Beide Proben wurden mit Hilfe des α -PlaB Antikörpers im Western Blot untersucht. Abbildung 3.25 A verdeutlicht, dass bezüglich des hitzeinaktivierten Pellets ein schwaches PlaB-Signal detektiert wurde (linker Blot, Bahn 2), wohingegen das zuerst lysierte und nach etwa 2 h mit SDS-Probenpuffer aufbereitete Lysat kein Signal zeigte. Des Weiteren wurden die Zelllysate der *lspDE*-Mutante und des *L. pneumophila* Wildtyps zusammen inkubiert und mittels α -PlaB Western Blot analysiert (Abb. 3.25 A, Spuren 3 und 4). Das Wildtyp Zelllysate allein diente hierbei als Kontrolle. Wie in Abbildung 3.25 A verdeutlicht, konnte hinsichtlich der zusammen inkubierten Lysate kein PlaB-Signal detektiert werden, wohingegen bei der Kontrolle dieses Signal auftrat.

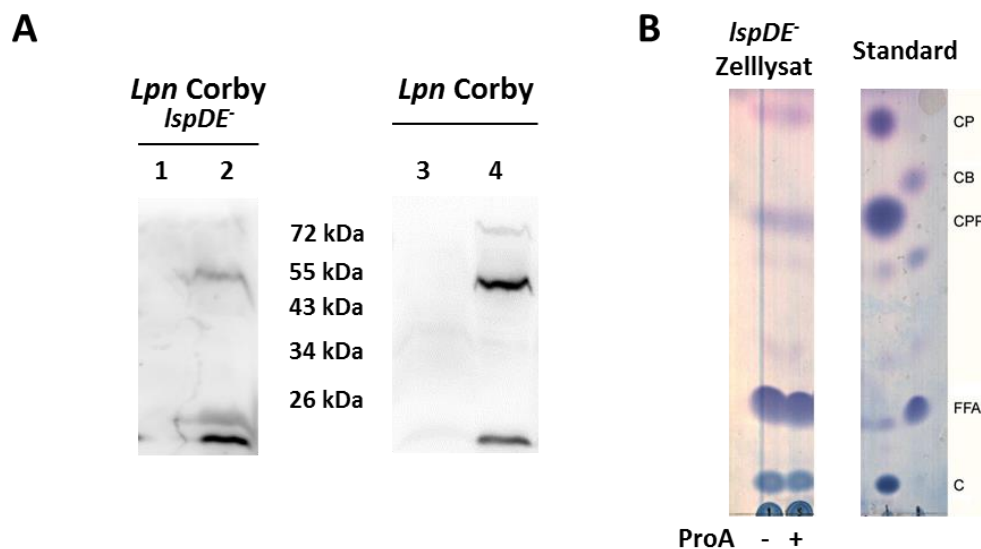


Abb. 3.25: Analyse des Zelllysates der *lspDE* (T2SS) Sekretionsmutante mittels α -PlaB Western Blot und Dünnschichtchromatographie. **A)** Western Blot Untersuchungen von *L. pneumophila* Lysaten mittels α -PlaB Antikörper. Die Zellpellets einer Kultur von *L. pneumophila* Corby *lspDE*-Mutante wurden zum einen in SDS-Probenpuffer resuspendiert und sofort bei 95 °C inkubiert (Bahn 2) und zum anderen in mit Lysozym versetztem Tris-Puffer lysiert (Bahn 1). Des Weiteren wurde *L. pneumophila* Corby Wildtyp Zelllysate mit Zelllysate der *lspDE*-Mutante inkubiert (Bahn 3). Als Kontrolle diente *L. pneumophila* Corby Wildtyp Zelllysate (Bahn 4). **B)** Dünnschichtchromatographische Analyse der Zelllysate der *L. pneumophila* Corby *lspDE*-Mutante. Der crude Extrakt wurde zunächst mit PG und Cholesterol bei 37 °C inkubiert. Nach erfolgter Lipidextraktion wurden die Proben mittels Dünnschichtchromatographie auf die Bildung von Cholesterolestern hin untersucht. Als Positivkontrolle wurde einem Ansatz aus *E. coli* BL21 gereinigtes ProA-His zugesetzt (+). Standards: C = Cholesterol, FFA = freie Fettsäuren, CPP = Cholesterolpropionat, CB = Cholesterolbutyrat, CP = Cholesterolpropionat.

Es stellte sich die Frage, welche Ursache für das Degradieren der Proteine im kruden Zelllysate der *lspDE*-Mutante verantwortlich sein könnte. Die Zink-Metalloproteinase ProA, welche über das Typ II-Sekretionssystem abgegeben wird, wurde bereits mehrfach mit der Prozessierung oder Degradation sekretierter Proteine in Zusammenhang gebracht (Rossier *et al.*, 2008, Lang *et al.*, 2012, Banerji *et al.*, 2008, Banerji *et al.*, 2005, McCoy-Simandle *et al.*, 2011, Conlan *et al.*, 1988, Hell *et al.*, 1993). In der *lspDE*-Mutante wird die Sekretion jedoch unterdrückt und ProA akkumuliert innerhalb der Zelle (Hales & Shuman, 1999, Rossier & Cianciotto, 2001). In der Vergangenheit konnte mittels Dünnschichtchromatographie (DC) gezeigt werden, dass PlaC durch ProA aktiviert wird (Lang *et al.*, 2012). Daher wurde das Zelllysate der *lspDE*-Mutante mittels DC auf Freisetzung von Cholesterolpalmitat (CP) und Cholesterolpropionat (CPP) getestet, was ein Zeichen für die Acyltransferaseaktivität von mit ProA aktiviertem PlaC ist (Lang *et al.*, 2012). Als Positivkontrolle wurde dem Zelllysate aus *E. coli* BL21 gereinigtes ProA zugesetzt, welche von Frau Dr. C. Lang zur Verfügung gestellt wurde (Lang *et al.*, 2012). Abbildung 3.25 B zeigt, dass die Inkubation des Zelllysates mit den Substraten von PlaC, PG und Cholesterol, zur Detektion der charakteristischen PlaC-Produkte CP und CPP führte. Dies war unabhängig von der Zugabe von gereinigtem ProA. Ein vergleichbares Ergebnis konnte mit der Positivkontrolle, nach ProA-Addition, gezeigt werden. Dieses Resultat verdeutlicht, dass in dem Zelllysate der Typ II-Sekretionsmutante Acyltransferaseaktivität nachweisbar war und deutet ebenfalls darauf hin, dass neben PlaC die Protease ProA ihre Aktivität entfaltet. Somit liegt es nahe, dass das zellassoziierte PlaB-Protein von ProA degradiert wurde.

Zusammenfassend zeigten die Daten der analysierten Sekretionsmutanten zur Untersuchung der Sekretion von PlaB, dass PlaB in allen getesteten Mutanten für Proteinase K zugänglich war und sich somit auf der Oberfläche der *tatC*, *lssB* (T1SS), *lspDE* (T2SS), *lvh* (T4ASS), *dotA* (T4BSS), *dotB* (T4BSS), *dotB/lvh* (T4BSS) Sekretionsmutanten befindet. Diese Sekretionssysteme sind vermutlich nicht essentiell für den Export und die nachfolgende Exposition von PlaB auf der Zelloberfläche.

3.5.2 Sekretionsanalysen N- und C-terminal verkürzter Varianten von PlaB

Bisher konnte im Rahmen dieser Arbeit kein Sekretionssystem für die Translokation von PlaB identifiziert werden. Aus diesem Grund sollten im Folgenden N- und C-terminale Proteinregionen, welche für die Sekretion eine wichtige Rolle spielen könnten, untersucht werden. Es bestand damit die Möglichkeit, Hinweise auf den zugrunde liegenden Sekretionsmechanismus von PlaB zu bekommen. Zu diesem Zweck wurden drei N-terminal und fünf C-terminal trunkierte Varianten sowie eine C-/N-terminal verkürzte *plaB*-Version in das pBCKS-Plasmid inseriert (s. Abb. 3.26). Damit bestand die Möglichkeit, alle Konstrukte in *L. pneumophila plaB1* Corby

mittels des endogenen Promoters konstitutiv zu exprimieren. Als Positivkontrolle wurde das pJB04-Plasmid mitgeführt, welches das *plaB*-Gen mit endogenem Promoter im pBCKS-Plasmid besitzt. *L. pneumophila* Corby *plaB1* Kulturen, welche C- und N-terminal trunkierte PlaB-Varianten sowie PlaB exprimierten, wurden bei einer OD₆₆₀ von ~1.9 geerntet. Für einen ersten Hinweis der Lokalisation der verkürzten Varianten wurden die Zelllysate der neun Stämme mittels Ultrazentrifugation in Membranfraktion (P) und zytosolische Fraktion (ÜS) getrennt. Als Kontrolle wurde das Volllängenkonstrukt mitgeführt, sowie die Proteine MOMP für die Membranfraktion und DnaK für die zytosolische Fraktion.

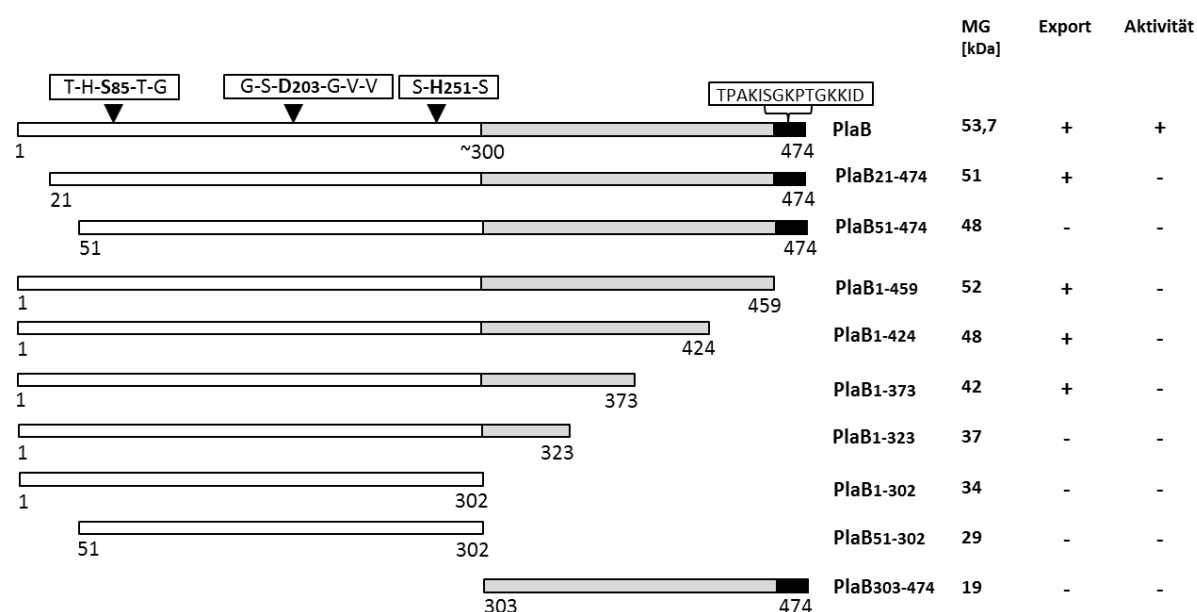


Abb. 3.26: Schematische Übersicht der untersuchten N- und C-terminal verkürzten PlaB-Varianten in Hinblick auf Sekretion. Es wurden N- und C-terminal verkürzte PlaB-Varianten kloniert (pKK48-51, pKK54-55, pKK58-60), um Proteinbereiche zu identifizieren, die putative Sekretionssignale tragen könnten. Die Zahlen geben die Anfang- bzw. Endamino-säuren der Proteinvarianten an. Beim Volllängenkonstrukt wurden die Bereiche des aktiven Zentrums mit den entsprechenden Sequenzmotiven eingezeichnet. Der N-terminale Bereich ist als weißer Balken und der C-terminale Bereich ist als grauer Balken gekennzeichnet. Die letzten 15 Aminosäuren, welche für die Aktivität eine wichtige Rolle spielen, sind als schwarzer Balken im C-terminalen Bereich hervorgehoben. MG = Molekulargewicht.

Die anschließende Detektion mit dem α -PlaB Antikörper im Western Blot zeigte, dass alle Konstrukte sowohl in der zytosolischen als auch in der Membranfraktion zu finden waren (Abb. 3.27). Da das PlaB-Signal in der Pelletfraktion etwas stärker war, scheint das PlaB-Volllängenkonstrukt, wie in Abschnitt 3.4, überwiegend in der Membranfraktion vorzuliegen (vergleiche Abb. 3.21 A und C). Die drei trunkierten Varianten PlaB_{aa21-474}, PlaB_{aa1-424} und PlaB_{aa1-373} verhielten sich wie das Volllängenprotein. Alle anderen Konstrukte wurden verstärkt in der zytosolischen Fraktion detektiert. Die Ergebnisse des Fraktionierungsexperimentes deuten an, dass einige Verkürzungen am PlaB-Protein bzw. die Deletion bestimmter Proteinbereiche einen

Einfluss auf die Translokation und somit die Exposition von PlaB an der Oberfläche haben. Um diese Beobachtung zu verifizieren, wurde im Folgenden die Zugänglichkeit der verkürzten PlaB-Varianten für Proteinase K getestet.

Legionella-Kulturen mit den konstitutiv exprimierten PlaB-Varianten bzw. PlaB wurden bei einer OD₆₆₀ von ~1.9 geerntet und mit Hilfe der Proteinase K-Degradation auf ihre Oberflächenpräsentation hin überprüft. Der etablierte Versuchsansatz wurde wie bei der Analyse der Sekretionsmutanten durchgeführt (siehe 3.5.1).

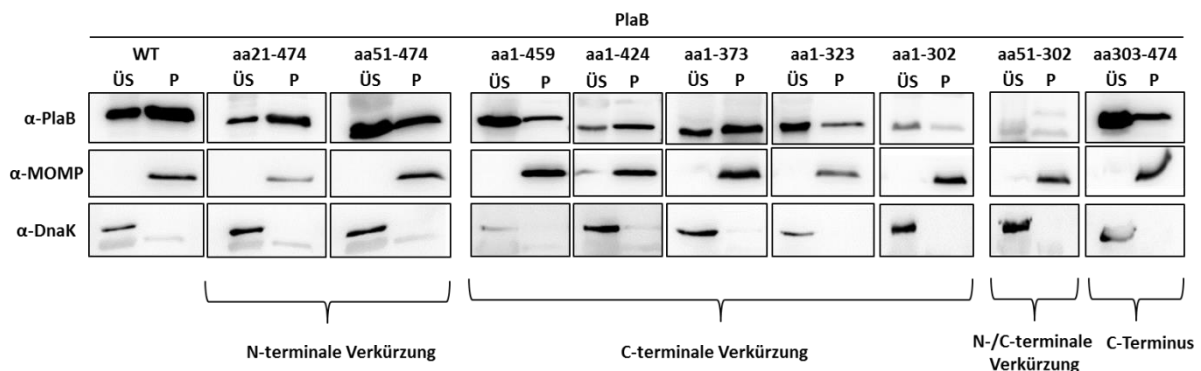
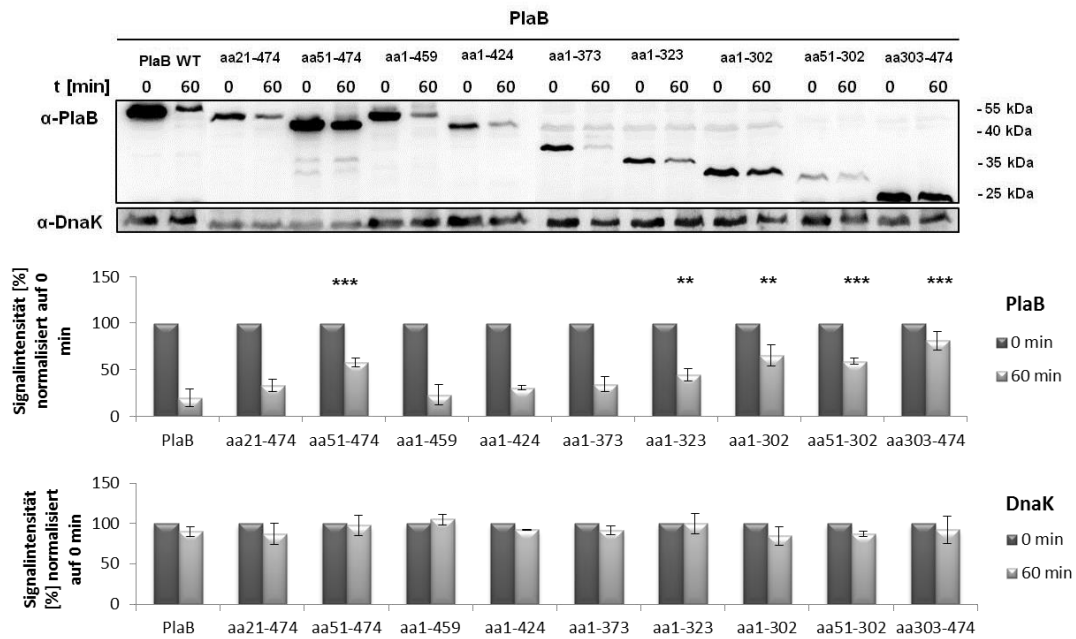


Abb. 3.27: Untersuchung zur Sekretion von PlaB mittels einfacher Fraktionierung N- und C-terminal verkürzter PlaB-Varianten in *L. pneumophila* Corby *plaB1*. Zelllysate von *L. pneumophila* Corby *plaB1*, welche C- und N-terminal trunkierte PlaB-Varianten (pKK48-51, pKK54-55, pKK58-60) sowie PlaB (pJB04) exprimierten, wurden mittels Ultrazentrifugation in zytosolische (ÜS) und Membranfraktion (P) getrennt. 20 µl jeder Fraktion wurde mittels Western Blot gegen PlaB, MOMP und DnaK untersucht. Die Daten sind repräsentativ für mindestens zwei unabhängig durchgeführte Experimente.

Die Untersuchung mittels des α-PlaB Antikörpers im Western Blot zeigte, dass die N-terminale Verkürzung von 20 Aminosäuren, die C-terminalen Verkürzungen von 15, 50 und 100 Aminosäuren keinen signifikanten Unterschied im Expositionsverhalten zum Volllängenkonstrukt zeigten (Abb. 3.28 A). Die Zugänglichkeit dieser vier PlaB-Varianten für Proteinase K war vergleichbar mit der des Wildtyps (Abb. 3.28 A). Im Gegensatz dazu waren die um 50 Aminosäuren N-terminal verkürzte Variante sowie die um 150 und 170 Aminosäuren C-terminal trunkierten PlaB-Varianten signifikant schlechter zugänglich für die Protease. Die Variante mit der N- und C-terminalen Verkürzung (PlaB_{aa51-302}) verhielt sich wie PlaB_{aa51-474} und vergleichbar zu der PlaB_{aa1-302}-Variante, deren Signalintensität nach 60-minütiger Inkubation mit Proteinase K geringfügig stärker war. Der *Legionella*-Stamm, der nur den C-terminalen Bereich exprimierte (PlaB_{aa303-474}), zeigte eine fast vollständige Unzugänglichkeit der Proteinase K zur verkürzten PlaB-Variante (Abb. 3.28 A), was darauf hindeutet, dass der C-Terminus für die Translokation nicht ausreichend ist. Als Kontrolle für die Intaktheit der Zellen wurde wiederum DnaK im Western Blot detektiert, welche bei allen Stämmen nach 60-minütiger Inkubation mit Proteinase K nicht signifikant degradiert wurde (Abb. 3.28 A).

A



B

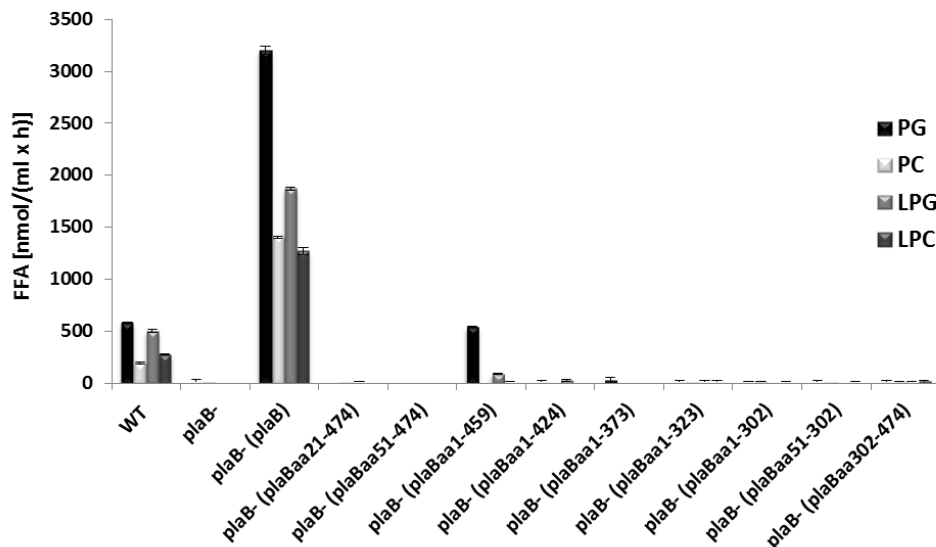


Abb. 3.28: Untersuchung zur Sekretion von PlaB mittels Proteinase K-Degradation N- und C-terminal verkürzter PlaB-Varianten in *L. pneumophila* Corby *plaB1*. **A)** Intakte Zellen von *L. pneumophila* Corby *plaB1*, welche C- und N-terminal trunkierte PlaB-Varianten (pKK48-51, pKK54-55, pKK58-60) sowie PlaB (pJB04) exprimierten, wurden auf die Zugänglichkeit von Proteinase K getestet. Es wurden je 20 µl Zellsuspension vor (0 min) bzw. nach 60-minütiger Inkubation mit Proteinase K bei 37 °C und anschließender PMSF-Inaktivierung mittels α-PlaB Western Blot analysiert. Als Kontrolle wurde DnaK detektiert. Die Signale von PlaB (oben) und DnaK (unten) wurden zusätzlich mit dem Programm ImageJ quantifiziert (<http://rsb.info.nih.gov/ij>). Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente, wobei die Quantifizierung die drei Experimente mittelt. T-Test (** P < 0.01, *** P < 0.001, n=3). **B)** *L. pneumophila* Corby *plaB1* Zelllysate mit den exprimierten N- bzw. C-terminal verkürzten PlaB-Varianten sowie PlaB wurden auf enzymatische Aktivität hin überprüft. Die Zelllysate wurden 1:100 verdünnt mit verschiedenen Phospholipiden (siehe Tab. 2.7) bei 37 °C für 30 min inkubiert und die Freisetzung der freien Fettsäuren (FFA) bestimmt. Das Zelllysate von *L. pneumophila* Corby Wildtyp (WT) wurde zum Vergleich 1:25 verdünnt und mitgeführt. Die Daten sind repräsentativ für Dreifachwerte von zwei unabhängigen Experimenten.

Zusammenfassend zeigten die Daten, dass mit zunehmender Verkürzung von PlaB die Zugänglichkeit für Proteinase K abnahm und somit die Translokationseffizienz vermutlich sank. Es deutete sich an, dass die Proteinregionen zwischen der 21. und 50. bzw. der 302. und 323. Aminosäure wichtig für die Translokation des Proteins sind.

Die neun *Legionella*-Stämme, welche die trunkierten PlaB-Varianten exprimierten, wurden zudem auf phospholipolytische Aktivität getestet. Keines der verkürzten PlaB-Proteine wies messbare PLA- oder LPLA-Aktivitäten auf (Abb. 3.28 B). Die in dieser Arbeit bereits untersuchte C-terminal verkürzte PlaB-Variante PlaB_{aa1-459} (vergleiche Abschnitt 3.1.2.1 Abb. 3.3) zeigte lediglich ~15% PG-abhängige PLA-Aktivität verglichen zur Aktivität des Volllängenproteins. Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass sowohl der N-terminale Bereich (die ersten 50 Aminosäuren) als auch der C-terminale Bereich wichtig für die enzymatische Aktivität des Proteins sind.

3.5.3 N-terminale Sequenzierung von PlaB

Die *in silico* Analyse bezüglich eines putativen Signalpeptides im N-terminalen Bereich des Proteins (vergleiche Abschnitt 3.1.1) gab keinen Hinweis auf eine solche Peptidsequenz, die Voraussetzung für eine Sekretion über das Tat- oder Sec-Translokationssystem wäre. Um diese Information zu untermauern, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine N-terminale Sequenzierung des in *L. pneumophila* Corby *plaB1* (pKK43) exprimierten PlaB-Strep durchgeführt.

Zu diesem Zweck wurde *plaB* mit einer C-terminalen Strep-Fusion in das pBCKS-Plasmid kloniert. Die entsprechende *Legionella*-Kultur wurde bei einer OD₆₆₀ von 1.9 geerntet und aus dem Zelllysate das Strep-fusionierte PlaB-Protein mittels StrepTactin-Sepharose isoliert. Eine Ausgangsmenge von 200 pmol gereinigtem PlaB-Strep der Elutionsfraktion wurde auf eine PVDF-Membran geblottet und in Kooperation mit Beate Jaschok-Kentner (Molekulare Strukturbiologie, HZI, Braunschweig) mittels Edman-Abbau analysiert. Es konnte nur eine N-terminale Sequenz bei dieser Analyse festgestellt werden, welcher der Anfangssequenz von PlaB entsprach (Abb. 3.29 A). Da keine N-terminale Verkürzung von PlaB detektiert werden konnte, ist das Vorhandensein eines Signalpeptides oder einer N-terminalen Prozessierung von PlaB als unwahrscheinlich einzustufen. Das Zelllysate der *L. pneumophila* Corby *plaB1* (pKK43) Kultur wurde zudem mittels Ultrazentrifugation in zytosolische und Membranfraktion getrennt, um festzustellen, ob sich das Strep-fusionierte Protein wie das Wildtypkonstrukt verhält. Die Western Blot Analyse in Abbildung 3.29 B verdeutlicht, dass PlaB-Strep sowohl in der zytosolischen als auch in der Membranfraktion detektiert wurde und somit analog zum Wildtypprotein sekretiert wird bzw. lokalisiert ist.

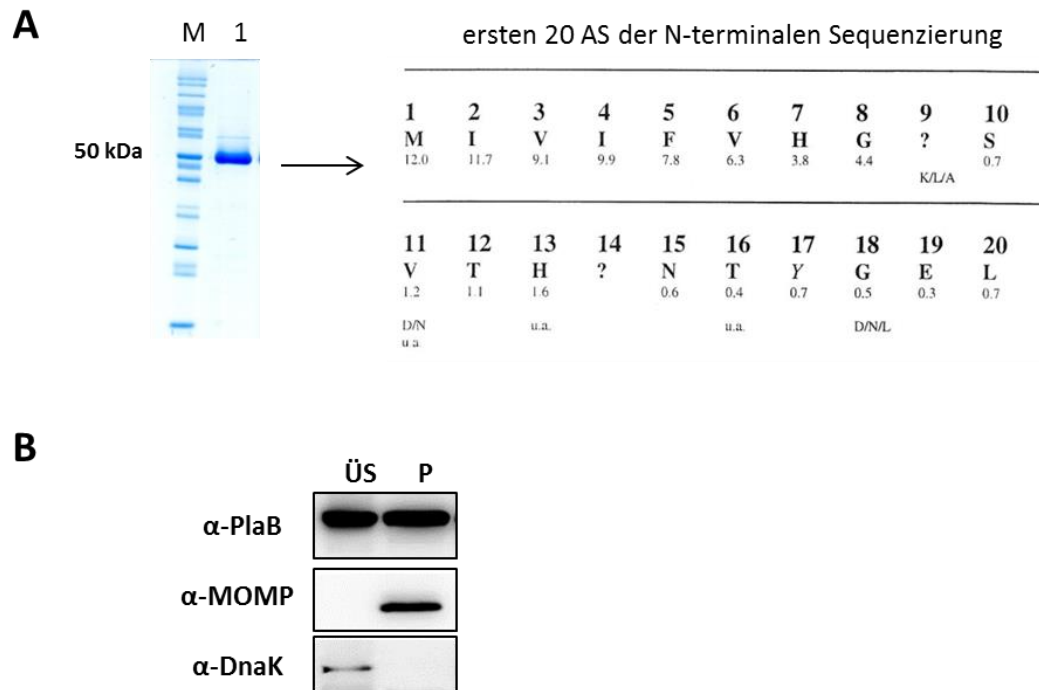


Abb. 3.29: Analyse der ersten 20 Aminosäuren von PlaB mittels Edman-Abbau. **A)** In *L. pneumophila* Corby *plaB1* (pKK43) exprimierte und gereinigte PlaB mit C-terminaler Strep-Fusion wurde mittels N-terminaler Sequenzierung untersucht. Das Coomassie-gefärbte SDS-Gel zeigt die Elutionsfraktion (1) der affinitätschromatographischen Reinigung mittels StrepTactin-Sepharose (links). Rechts ist die Sequenz der ersten 20 Aminosäuren nach dem Edman-Abbau gezeigt. **B)** Western Blot Analyse der Fraktionierung des Zelllysates von *L. pneumophila* Corby *plaB1* (pKK43) in zytosolische (ÜS) und Membranfraktion (P) mittels α-PlaB, α-MOMP und α-DnaK Antikörper.

3.6 Funktionelle Analyse von PlaB - Zusammensetzung der Membranlipide in *L. pneumophila*

Die vorangegangenen Abschnitte beschäftigten sich mit der biochemischen und strukturellen Charakterisierung von PlaB sowie mit der Lokalisation und Sekretion dieser PLA. Dabei kristallisierte sich heraus, dass das Protein in Abhängigkeit von der Konzentration als Monomer, Dimer bzw. Tetramer vorliegt und hauptsächlich auf der Zelloberfläche exponiert ist. Jedoch gibt es noch keine Informationen über die Funktion von PlaB. Phospholipasen können auf unterschiedliche Weise zur Pathogenität eines Bakteriums beitragen. Aus der Literatur ist bekannt, dass diese Enzyme Membranen bzw. Zellen mittels ihrer zytolytischen Eigenschaften zerstören oder Signalkaskaden innerhalb der Wirtszelle manipulieren können (s. 1.4; (Kuhle & Flieger, 2014)). Bisher konnte in Bezug auf PlaB gezeigt werden, dass *plaB*-Mutanten in Infektionsmodellen, wie Makrophagen und Amöben, keine Attenuierung im Vergleich zum Wildtyp aufweisen (Bender *et al.*, 2009, Flieger *et al.*, 2004). Allerdings konnte anhand des Meerschweinchenmodells demonstriert werden, dass die *plaB*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp in ihrer Replikationsfähigkeit in der Lunge und in der Dissemination zu weiteren Organen, wie

der Milz beeinträchtigt war. Darüber hinaus konnte eine partielle Zerstörung des Lungengewebes im Fall des Wildtypbakteriums und nur eine geringfügige Beeinträchtigung durch die *plaB*-Mutante festgestellt werden (Schunder *et al.*, 2010). PlaB wird demnach eine wichtige Rolle als Virulenzfaktor zugeordnet (Kuhle & Flieger, 2014). Durch Phospholipasen besteht, neben der Beeinflussung der Wirtszelle, ebenfalls die Möglichkeit, dass die eigene bakterielle Membran zur Adaptation an Umweltbedingungen verändert wird. Daher war es von Interesse zu erfahren, ob die zellassoziierte PLA PlaB die Zusammensetzung der *Legionella*-Membranen während der verschiedenen Wachstumsphasen beeinflusst. Zu diesem Zweck wurden *Legionella*-Flüssigkulturen vom Corby Wildtyp und der *plaB*-Mutante in BYE-Bouillon bei 37 °C für 72 h kultiviert. Aus der exponentiellen Phase (OD_{660} ~0.9 und ~1.5), der späten exponentiellen Phase (OD_{660} 1.8-1.9) und der stationären Phase (nach 48 und 72 h) wurden jeweils Aliquote entnommen, um die polaren Lipide und die Fettsäurezusammensetzung der zwei Stämme in den unterschiedlichen Wachstumsphasen mittels Dünnschicht- und Gaschromatographie zu analysieren. Dies wurde in Kooperation mit Herrn Dr. B. J. Tindall (Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig) durchgeführt.

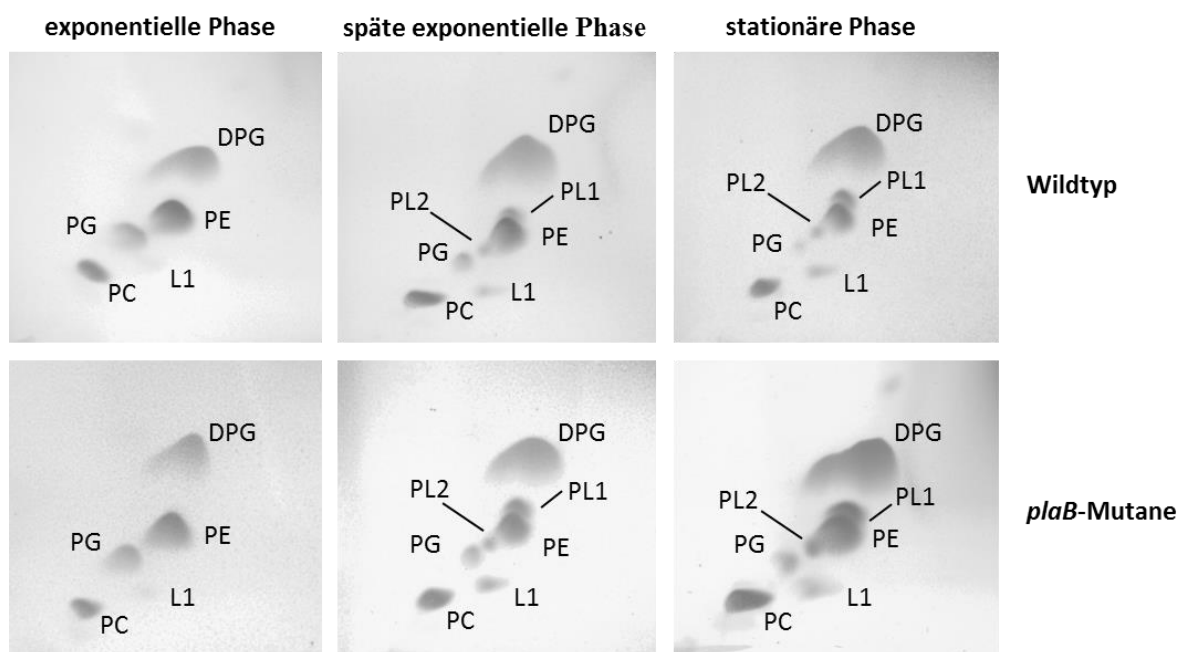


Abb. 3.30: Vergleichende Analyse der polaren Lipide mittels Dünnschichtchromatographie (DC) zwischen *L. pneumophila* Wildtyp und *plaB*-Mutante unterschiedlicher Wachstumsphasen. *L. pneumophila* Flüssigkulturen vom Corby Wildtyp und von der *plaB1*-Mutante wurden in BYE bei 37 °C für 72 h kultiviert. Aus jeder Wachstumsphase (exponentielle Phase = OD_{660} ~0.9; späte exponentielle Phase = OD_{660} ~1.8-1.9; stationäre Phase = 72 h) wurden 100 mg gefrorenes Zellmaterial mittels DC analysiert. Abkürzungen: DPG = Diphosphatidylglyzerol; PG = Phosphatidylglyzerol; PC = Phosphatidylcholin; PE = Phosphatidylethanolamin; L1 = Lipid; PL1 = Phosphatidylmonomethylethanolamin; PL2 = Phosphatidylmonomethylethanolamin.

Die Untersuchung der polaren Lipide mittels Dünnschichtchromatographie ergab keinen Unterschied zwischen den Stämmen innerhalb der verschiedenen Wachstumsphasen (Abb. 3.30). Es zeigte sich aber, dass sich die Lipidzusammensetzung von der exponentiellen zur stationären Phase hin verändert. In der exponentiellen Phase konnten PG, Phosphatidylethanolamin (PE), PC, Diphosphatidylglyzerol (DPG) und ein nicht identifiziertes Lipid (L1) detektiert werden. Von der späten bis hin zur stationären Phase wurden zudem noch zwei weitere Phospholipide detektiert, welche anhand der Referenzwerte Phosphatidylmonomethylethanolamin und Phosphatidyltrimethylethanolamin zugeordnet werden können. Die Zusammensetzung der polaren Membranlipide war hierbei unabhängig von der Aktivität von PlaB, da sich die Dünnschichtchromatographien des Wildtypes und der *plaB*-Mutante nicht unterschieden. Die Analyse der Fettsäurezusammensetzung mittels Gaschromatographie zeigte ebenfalls keinen konsistenten bzw. gravierenden Unterschied zwischen dem Wildtyp und der *plaB*-Mutante innerhalb der untersuchten Wachstumsphasen. Jedoch zeigte sich eine Veränderung der Fettsäurezusammensetzung während der Wachstumsphasen bei beiden Stämmen.

Tab. 3.2: Relative Mengen der zellulären Fettsäuren von *L. pneumophila* Corby Wildtyp (WT) und *plaB*-Mutante (*plaB1*).

Fettsäure	relative Menge der Fettsäuren [%]									
	WT					<i>plaB1</i>				
	OD ₆₆₀ ~ 0.9	OD ₆₆₀ ~1.5	OD ₆₆₀ ~1.9	48 h	72 h	OD ₆₆₀ ~ 0.9	OD ₆₆₀ ~1.5	OD ₆₆₀ ~1.8	48 h	72 h
14:0 iso	3,87	5,98	11,45	13,73	10,97	3,45	6,02	8,68	11,92	12,81
15:0 anteiso	7,62	9,63	11,14	12,06	11,31	6,50	8,81	10,40	10,80	11,09
16:0 iso	20,72	25,32	37,35	35,5	39,54	25,54	24,56	30,41	39,79	36,99
16:1 ω7c	32,96	32,3	20,71	15,01	14,04	28,36	33,00	26,48	14,12	12,72
16:0	19,73	12,5	3,02	1,45	1,68	20,68	12,75	7,07	2,17	1,51

Mit Hilfe gaschromatographischer Analysen wurden die relativen Mengen an zellulären Fettsäuren bestimmt. Gezeigt sind die Fettsäuren mit signifikanter Änderung der relativen Fettsäuremenge im Verlauf der Wachstumsphasen (OD₆₆₀ = 0.9-1.5 = exponentielle Phase; OD₆₆₀ = 1.8-1.9 = späte exponentielle Phase; 48 h/72 h = stationäre Phase).

In Tabelle 3.2 sind die Fettsäuren aufgeführt, die eine signifikante Änderung in der relativen Menge aufwiesen. So erhöhte sich die relative Menge der gesättigten, verzweigten Fettsäuren Iso-Myristinsäure (14:0 iso), Anteiso-Pentadecansäure (15:0 anteiso) und Iso-Palmitinsäure (16:0 iso) bei Austritt aus der exponentiellen Phase. Im Vergleich dazu sanken die relativen Mengen der ungesättigten Fettsäure Palmitoleinsäure (16:1 ω7c) und der gesättigten Palmitinsäure (16:0) zur stationären Phase hin ab.

Zusammenfassend deuten diese Experimente darauf hin, dass die Änderungen der Zusammensetzung der polaren Membranlipide und der zellulären Fettsäuren unter den getesteten Bedingungen nicht auf PlaB zurückzuführen sind.

4 Diskussion

Der Erreger der Legionärskrankheit *Legionella pneumophila* verfügt über eine Vielzahl von Phospholipasen, die sowohl sekretiert werden, aber auch zellassoziiert vorkommen und potentiell zur Virulenz des Erregers beitragen (Kuhle & Flieger, 2014). Ein Vertreter der Phospholipasen A aus *L. pneumophila* ist das in dieser Arbeit untersuchte PlaB. Dieses Enzym wurde erstmals während einer Selektion auf hämolytische *Escherichia coli* Klone, die eine *L. pneumophila* Genbibliothek exprimierten, entdeckt (Flieger *et al.*, 2004) und ist der erste beschriebene Vertreter der nach diesem Enzym benannten neuen PlaB-Lipasefamilie (Bender *et al.*, 2009).

4.1 PlaB in Reinform – ein wichtiger Schritt für weitere Charakterisierungen

Studien zur individuellen Wirkungsweise der Phospholipasen in *L. pneumophila* hinsichtlich der biochemischen und funktionellen Eigenschaften sind für ein besseres Verständnis ihrer Funktion notwendig. Ein wichtiger Schritt ist hierbei die Reinigung des Enzyms. Dies ist bisher nur für zwei Phospholipasen A, VipD und PlaC, erfolgt, um strukturelle aber auch biochemische Analysen durchzuführen, die zum Verständnis ihrer Wirkungsweise beitragen (s. 4.5 und 1.5) (Ku *et al.*, 2012, Lang *et al.*, 2012). Im Rahmen dieser Arbeit war es somit essentiell, PlaB als lösliches und aktives Protein in Reinform zu gewinnen, um das Enzym strukturell und biochemisch zu charakterisieren. Zudem ermöglicht das reine Protein die Generierung eines funktionellen Antikörpers gegen PlaB, was im Weiteren die Voraussetzung für Lokalisations- und Sekretionsanalysen darstellte.

Bisherige Versuche, PlaB zu reinigen, führten nicht zum Erfolg. Dabei zeigte sich, dass unter anderem die Fusion mit einem 6xHis- bzw. GST-Tag nicht zur Gewinnung des löslichen und aktiven Enzyms führte. Es kristallisierte sich heraus, dass PlaB stark zu Aggregationen neigt, was die Isolierung der löslichen Form erschwerte (Bender, 2009*). Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit weitere Strategien zur Reinigung getestet. Die Koexpression mit verschiedenen Chaperonen ist eine Möglichkeit, um die Aggregation von schwer löslichen Proteinen zu vermeiden. So konnte die Löslichkeit eines Endostatins aus der Maus und die des humanen Sauerstoff-regulierenden Proteins ORP150 maßgeblich verbessert werden (Nishihara *et al.*, 2000). Die in dieser Arbeit untersuchte Koexpression von GST-PlaB mit den Chaperonkomplexen DnaK-DnaJ-GrpE und GroEL-GroES trug jedoch nicht wesentlich zur Verbesserung der Löslichkeit bei.

Die N-terminale Fusionierung von MBP, einem in der Literatur bekannten Löslichkeitsvermittelnden Tag (Kapust & Waugh, 1999, Nallamsetty & Waugh, 2006), an PlaB ermöglichte zum ersten Mal die Reinigung von löslichem und aktivem Protein (Abb. 3.7). Da das MBP-Protein 43 kDa groß und damit nur ~10 kDa kleiner als PlaB ist, war es von Interesse,

diesen N-terminalen Tag nach erfolgter Reinigung abzuspalten. Es wurden drei Konstrukte mit unterschiedlichen Proteaseschnittstellen und den dazugehörigen Proteasen (Faktor Xa, Enterokinase und Prescission Protease Schnittstelle) zur Abspaltung der Fusion eingesetzt. Jedoch konnte bei keiner Protease ein vollständiger Verdau von MBP-PlaB erreicht werden. Dies ist möglicherweise auf eine durch sterische Hinderung unzugängliche Proteaseschnittstelle zurückzuführen. Insgesamt stellte sich heraus, dass die effiziente Abspaltung der MBP-Fusion sowie die Separierung und Anreicherung von PlaB in größeren Mengen mit diesem löslichkeitsvermittelnden Tag unter den zahlreich getesteten Bedingungen nicht möglich war. Erst ein kleines aus 8 Aminosäuren bestehendes Peptid, der Strep-Tag, führte als N-terminale Fusion an PlaB zur erfolgreichen Reinigung von löslichem und aktivem Protein in ausreichenden Mengen (~5 mg Protein pro Liter Kulturvolumen). Im Vergleich zur MBP-Fusion wurden schon nach dem ersten Reinigungsschritt Elutionsfraktionen mit hohem Reinheitsgrad erhalten (s. Abb. 3.9). Dies bestätigt die in der Literatur beschriebenen Erfahrungen mit dem Strep-Tag, wobei mittels der affinitätschromatographischen Reinigung sehr reines Protein in guter Ausbeute erhalten wurde (Lichty *et al.*, 2005, Korndörfer *et al.*, 2004). Neben PlaB wurden noch zwei weitere Proteine in sehr geringer Menge in der Elutionsfraktion nach dem ersten Reinigungsschritt detektiert (s. Abb. 3.9), welche mit Hilfe von Massenspektrometrie als zwei *E. coli* Chaperone identifiziert wurden. Ein anschließender zweiter Reinigungsschritt mittels Größenausschlusschromatographie (SEC) konnte diese beiden Fremdproteine entfernen (Abb. 3.11). Da der Strep-Tag die Proteinfaltung und Sekretion seines Fusionspartners und vor allem die Proteinfunktion nicht beeinträchtigt (Schmidt & Skerra, 2007), wurde seine Abspaltung von PlaB nicht als notwendig erachtet. Zudem wird er als biochemisch inert beschrieben und bei Analysen funktioneller Proteine verwendet (Schmidt & Skerra, 2007). Die Aktivitätsanalysen von Strep-PlaB bestätigten, dass die Fusion die Aktivität des Enzyms nicht beeinträchtigte (s. Abb. 3.9 und Abb. 3.3, vergleiche 4.2).

PlaB hydrolysiert sowohl Phospholipide, wie Phosphatidylglyzerol (PG) und Phosphatidylcholin (PC), als auch die entsprechenden Lysophospholipide Lysophosphatidylglyzerol (LPG) und Lysophosphatidylcholin (LPC). Dabei präferiert das Enzym Fettsäureketten mit mehr als acht Kohlenstoffatomen (Bender *et al.*, 2009, Flieger *et al.*, 2004). Bisherige Untersuchungen zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität wurden nur mit *L. pneumophila* Zelllysaten und *E. coli* Zelllysaten mit rekombinant exprimiertem PlaB durchgeführt (Bender *et al.*, 2009, Flieger *et al.*, 2004). Es konnte demonstriert werden, dass die zellassoziierte PLA-Aktivität von *L. pneumophila* im Vergleich zur sekretierten PLA-Aktivität 100fach stärker ist. Somit konnte PlaB die stärkste PLA/LPLA-Aktivität für sowohl in Bouillon als auch im Zellkultur-Infektionsmodell gewachsene *L. pneumophila* Kulturen zugewiesen werden (Bender *et al.*, 2009, Flieger *et al.*, 2004). Die Reinigung von löslichem und aktivem PlaB aus *E. coli* Zelllysate ermöglichte nun die Berechnung

der spezifischen Aktivität. Für die Phospholipide PG und PC konnte eine spezifische Aktivität von ~2955 U/mg bzw. ~1100 U/mg ermittelt werden. Verglichen mit der spezifischen Aktivität der sekretierten *L. pneumophila* PLA PlaA, die nur ~6 U/mg (PG) bzw. ~3,5 U/mg (PC) aufwies (Masterarbeit T. Gerlach, unveröffentlichte Daten), besitzt PlaB eine hohe spezifische Aktivität gegenüber Phospholipiden, was mit den bereits erwähnten Aktivitätsdaten der *L. pneumophila* Kulturen korreliert. Ein Vergleich mit PLAs aus Säugetieren, wie z.B. der Pankreaslipase GPLRP2 aus dem Meerschweinchen oder einer PLA₂ aus dem Schweinepankreas, denen mit 570 U/mg bzw. 700 U/mg eine hohe Phospholipaseaktivität zugeschrieben wird (Carrière *et al.*, 1998), und einer sekretierten PLA₂ aus *Arabidopsis thaliana* (AtsPLA₂- α), deren höchste spezifische Aktivität gegenüber Phospholipiden ~35 U/mg betrug (Mansfeld & Ulbrich-Hofmann, 2007), legt die Schlussfolgerung nahe, dass PlaB ein sehr aktives Enzym ist. Zudem besitzt PlaB eine hohe spezifische Aktivität gegenüber den Lysophospholipiden LPG (1487 U/mg) und LPC (1052 U/mg), die vergleichbar mit den spezifischen Aktivitäten der sekretierten PLA PlaA (LPG = 1329 U/mg, LPC = 1437 U/mg) ist (Masterarbeit T. Gerlach, unveröffentlichte Daten).

Die Reinigung von löslichem und aktivem Strep-PlaB schaffte schließlich die Voraussetzung für biochemische und strukturelle Analysen, die in den folgenden Abschnitten diskutiert werden.

Frühere Versuche zur Generierung eines α -PlaB Antikörpers mittels synthetisch hergestellter PlaB-Peptide bzw. aus der SDS-PAGE extrahierter Banden des rekombinant exprimierten und gereinigten Calmodulinbindeprotein-PlaB führten nicht zur erfolgreichen Detektion von PlaB im *L. pneumophila* Wildtyp. Es wurde spekuliert, dass das PlaB-Protein in wildtypischen Legionellen in so geringen Mengen vorkommt, dass eine Detektion mittels Western Blot nicht möglich ist (Schunder, 2010*). Daher konnten bisherige Studien zur Sekretion und Lokalisation von PlaB nur auf indirekte Weise über die Aktivität des Proteins durchgeführt werden (Schunder *et al.*, 2010). Aufgrund der erfolgreichen Reinigung des PlaB-Proteins war es im Rahmen dieser Arbeit möglich, einen funktionellen Antikörper gegen PlaB zu generieren. Für die Immunisierung zweier Kaninchen wurde eine katalytisch inaktive PlaB_{D203N}-Mutante mit N-terminalem Strep-Tag eingesetzt, da PlaB bekannterweise hämolytische Aktivitäten besitzt und somit toxische Eigenschaften aufweisen könnte (Bender *et al.*, 2009, Flieger *et al.*, 2004). Bei der Überprüfung des α -PlaB Antiserums zeigten sich sowohl im Western Blot der *E. coli* BL21 Zelllysate als auch im Western Blot der *Legionella*-Lysate neben der PlaB-spezifischen Bande in Höhe von 55 kDa noch weitere unspezifische Banden (Abb. 3.10). Diese konnten jedoch durch Präadsorption des Antiserums gegen die Zelllysate von *E. coli* BL21 bzw. *L. pneumophila* *plaB1* verringert werden. Somit war es in dieser Arbeit zum ersten Mal möglich, PlaB in *L. pneumophila* Corby Wildtyp zu detektieren. Die Gewinnung eines funktionellen Antikörpers ermöglichte nun Lokalisations- und Exportanalysen auf direkte Weise, die an späterer Stelle diskutiert werden (s. 4.4).

4.2 Identifizierung wichtiger Aminosäuren für die enzymatische Aktivität von PlaB

Für die Hydrolyse der spezifischen Substrate nutzt PlaB eine katalytische Triade bestehend aus Ser₈₅, Asp₂₀₃ und His₂₅₁ im N-terminalen Bereich des Proteins. Die C-terminale Region von etwa 170 Aminosäuren trägt ebenfalls zur enzymatischen Aktivität von PlaB bei (Bender *et al.*, 2009). Wie die C-terminale Region die Aktivität des Enzyms unterstützt oder zur Aktivität beiträgt, ist jedoch noch nicht verstanden.

4.2.1 Bedeutung der letzten 15 Aminosäuren für enzymatischen Aktivität von PlaB

Die getrennte Expression des N- und C-terminalen Bereiches von PlaB und ein anschließendes Zusammenführen der beiden Regionen konnte die Aktivität des Enzyms nicht wiederherstellen. Dies konnte im Falle von ExoU aus *Pseudomonas aeruginosa* beobachtet werden (Finck-Barbançon & Frank, 2001). Mittels Transfektionsanalysen wurde hier festgestellt, dass mehrere Domänen von ExoU für die toxische Reaktion des Enzyms erforderlich sind. Die zur Familie der Patatin-ähnlichen Proteine (PLP) gehörende PLA ExoU besitzt, ebenso wie PlaB, ein katalytisch aktives Zentrum im N-terminalen Bereich des Proteins (Bender *et al.*, 2009, Sato *et al.*, 2003). Aber im Unterschied zu PlaB konnte die Koexpression der N- und C-terminalen Domäne von ExoU die zytotoxische Aktivität des Enzyms wiederherstellen. Die alleinige Expression der N-terminalen Domäne bzw. der C-terminalen Domäne resultierte hingegen nicht in einem toxischen Phänotyp (Finck-Barbançon & Frank, 2001). Daher liegt die Schlussfolgerung nahe, dass das gesamte Proteinmolekül für die enzymatische Aktivität von PlaB benötigt wird. Dies wird mittels der Aktivitätsanalyse der C- und N-terminal verkürzten PlaB-Varianten aus den Sekretionsuntersuchungen unterstützend belegt (Abb. 3.28). Die Trunkierung von 20 Aminosäuren im N-terminalen Bereich sowie Verkürzungen des C-Terminus von PlaB reichen zur Inaktivierung des Enzyms aus.

Bezüglich des C-Terminus ist bereits bekannt, dass eine Kürzung um 15 Aminosäuren die enzymatische Aktivität aufhebt (Bender *et al.*, 2009). Um den Bereich innerhalb der letzten 15 Aminosäuren einzugrenzen, wurden zwei weitere verkürzte Versionen von PlaB generiert und untersucht. Es stellte sich heraus, dass schon das Fehlen von 5 bzw. 10 Aminosäuren die PLA/LPLA-Aktivität sukzessive reduzierte (Abb. 3.3). Dabei wurde die PC-abhängige PLA-Aktivität bei der um 10 Aminosäuren verkürzten Variante völlig aufgehoben. Parallel dazu reduzierte sich ebenfalls die hämolytische Aktivität der verkürzten PlaB-Varianten, was mit dem schon bekannten Zusammenhang zwischen der PC-spezifischen PLA-Aktivität und der hämolytischen Aktivität stimmig ist (Bender *et al.*, 2009). Für sekretierte eukaryotische PLA₂ der Klasse II ist bekannt, dass ihre C-terminale Extension viele geladene Aminosäuren enthält, die

unter anderem an der Substratbindung und der Katalyse beteiligt sind (Scott & Sigler, 1994). Des Weiteren besitzen die Mitglieder der sogenannten Pankreaslipase-Genfamilie, ebenfalls eine N-terminale Domäne mit der typischen katalytischen Triade aus Ser-Asp-His und eine C-terminale Domäne, deren strukturelle Merkmale eine wichtige Rolle in der Substratselektivität gegenüber Triglyzeriden und Phospholipiden spielen (Carrière *et al.*, 1998). Das aktive Zentrum wird dabei von einer sogenannten Deckel-Domäne bedeckt, die diese Präferenz entweder für das Triglyzerid oder das Phospholipid als Substrat unterstützt (Dugi *et al.*, 1992, Dugi *et al.*, 1995, Griffon *et al.*, 2006). Im Vergleich zu anderen Mitgliedern der Pankreaslipase-Genfamilie besitzen die bereits erwähnte Pankreaslipase GPLRP2 sowie eine PLA₁ DolmI aus der Hornisse eine verkürzte Variante der Deckel-Domäne, die eine größere Hydrophilie aufgrund der Aminosäurezusammensetzung aufweist. Dieser erhöhte hydrophile Anteil wird mit der PLA-Aktivität in Verbindung gebracht (Carrière *et al.*, 1998). Interessanterweise trägt die C-terminale Domäne bei den Lipoprotein-Lipasen, den hepatischen Lipasen und den Endothel-Lipasen zur Lipidbindung und somit auch zur Substratspezifität bei (Wong *et al.*, 1991, Davis *et al.*, 1992, Keiper *et al.*, 2001, Griffon *et al.*, 2009). Wie auch für PlaB gezeigt, führt das Fehlen der C-terminalen Domäne der Endothel-Lipase zum Aktivitätsverlust gegenüber Phospholipiden (Bender *et al.*, 2009, Gauster *et al.*, 2005, Griffon *et al.*, 2009). Bezüglich PlaB wurden die polaren Aminosäuren innerhalb der letzten 15 Aminosäuren mittels einer Alanin-Mutagenese im Hinblick auf die enzymatische Aktivität näher untersucht. Interessanterweise trägt jede polare Aminosäure innerhalb der letzten 15 Aminosäuren zur PLA/LPLA-Aktivität des Enzymes bei. Zusätzlich wurden zwei weitere polare Aminosäuren außerhalb der letzten 15 Aminosäuren mutiert, was zu keiner signifikanten Änderung der PLA/LPLA-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp führte. Ein ähnliches Verhalten wurde für eine PLA₂ aus *Bothrops jararacussu*, Bothropstoxin-I (BthTx-I), beobachtet. Die durchgeführte Alanin-Mutagenese bei dieser Phospholipase identifizierte polare Aminosäuren innerhalb einer C-terminalen Schleifen-Region des Proteins, welche zur Membranpermeabilisierung und somit zur Enzymaktivität beitragen (Chioato *et al.*, 2007). Daher ist es für PlaB vorstellbar, dass die polaren Aminosäuren innerhalb der letzten 15 Aminosäuren einen wesentlichen Beitrag zur Substratbindung sowie -umsetzung leisten.

Die Aktivitätsstudien des C-terminalen Bereiches von PlaB deuten darauf hin, dass der C-Terminus, vor allem die letzten 15 Aminosäuren, eine wichtige Funktion hinsichtlich der Substratbindung sowie Substratselektivität, aber auch bei der Unterstützung der Katalyse sowie der Verbesserung des Zugangs für die Phospholipidsubstrate für das Enzym übernimmt. Ähnlich wie die Gruppe um R. Verger, die basierend auf der 3D-Struktur der humanen Pankreaslipase, GPLR2-Chimären und DolmI PLA1 über strukturelle Merkmale und kinetische Eigenschaften ein

besseres Verständnis der Struktur-Funktion-Beziehung erhielt (Carrière *et al.*, 1998), könnte mittels der Kristallstruktur von PlaB der genaue Funktionsmechanismus für den C-terminalen Bereich aufgeklärt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden erste Kristallisationsversuche mit dem aus *E. coli* BL21 (pKK19) gereinigten Strep-PlaB, aber auch verschiedenen PlaB-Mutanten, in Kooperation mit Prof. Dirk Heinz, Dr. Jörn Krauß und Sally Pham Thanh Van (HZI, Braunschweig) durchgeführt. Erste Kristalle zeigten jedoch keine zufriedenstellende Streuung. Daher wird weiterhin an der Verfeinerung der Kristallisationsbedingungen gearbeitet, um eine verbesserte Streuung des Proteinkristalls zur Aufklärung der 3D-Struktur zu erhalten.

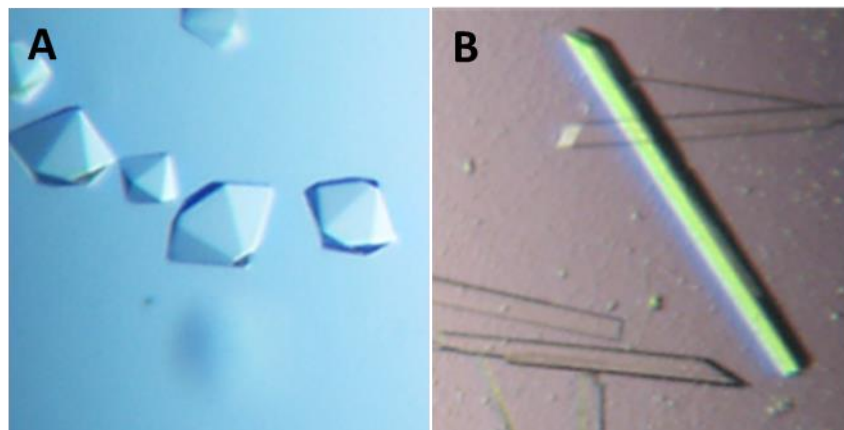


Abb. 4.1: PlaB-Kristalle. Lichtmikroskopische Aufnahmen von PlaB-Kristallen mit hexagonaler (A) und Nadelform (B) (Sally Pham Thanh Van).

4.2.2 Identifizierung weiterer für die PlaB-Aktivität wichtige Aminosäuren

Die ortsspezifische Mutagenese deckte die Wichtigkeit der polaren Aminosäuren innerhalb der letzten 15 Aminosäuren für die enzymatische Aktivität von PlaB auf. Das Enzym besitzt allerdings eine C-terminale Extension von etwa 170 Aminosäuren. Um weitere neue Aminosäuren für die Aktivität von PlaB zu identifizieren, insbesondere innerhalb der C-terminalen Region des Proteins, wurden mittels Zufallsmutagenese mit anschließender Selektion der transformierten *E. coli* Klone auf einen hämolytischen Defekt weitere PlaB-Mutanten mit einer *missense* Punktmutation entdeckt. Von den insgesamt 907 generierten *E. coli* Transformanten erwiesen sich 12% als nicht hämolytisch, von denen 69% das mittels PCR nachgewiesene *plaB*-Gen enthielten. Mittels der Sequenzierung des *plaB*-Gens dieser 76 Klone wurden, neben dem schon bekannten Asp₂₀₃ der katalytischen Triade, 22 neue Aminosäuren identifiziert, die für die hämolytische und somit auch für die PC-abhängige PLA-Aktivität essentiell sind. Die Aktivitätsanalyse mit PG als Substrat zeigte, dass bei der Mutation von 12 der 22 neu gefundenen Aminosäuren ebenso die PG-abhängige Aktivität beeinflusst war (Abb. 3.5). Bereits kleine Veränderungen, nämlich die Substitution einzelner Aminosäuren, haben substantielle Auswirkungen auf die Aktivität von PlaB

gegenüber PC aber auch PG gezeigt. Warum das cholinhaltige Phospholipidsubstrat durch einzelne Aminosäureaustausche nicht mehr hydrolysiert wird, lässt sich aufgrund der chemischen Struktur nicht erklären. Im Gegensatz dazu wird das glyzerinhaltige Substrat bei 10 der 23 Punktmutationen mehr oder weniger gut umgesetzt. Vermutlich sind cholinhaltige Phospholipide nicht die bevorzugte Substratvariante von PlaB, was auch in vorherigen Studien vermutet wurde (Bender *et al.*, 2009).

Bei einem Vergleich der Proteinsequenz von PlaB mit homologen Proteinsequenzen zeigte sich zudem, dass 13 der 22 neu entdeckten Aminosäuren innerhalb der uncharakterisierten Proteine zum größten Teil hoch konserviert sind (s. Anhang). Zu diesen konservierten Aminosäureresten zählt das Val₆ und Trp₉, welche als Teil einer hydrophoben Tasche das zentrale Glycin (IFVHGWS) der Oxyanion-Bindetasche umgeben (Jaeger *et al.*, 1993). Dem in diesem Bereich bereits identifizierten His₇ wurde eine stabilisierende Funktion der im Katalysemechanismus gebildeten ionischen Zwischenstufen (tetraedrische Intermediate bzw. Übergangszustände) während der Hydrolyse von Lipidsubstraten zugesprochen (Bender *et al.*, 2009). Daher ist anzunehmen, dass die zwei weiteren identifizierten Aminosäurereste Val und Trp als Teil der hydrophoben Tasche eine unterstützende bzw. stabilisierende Wirkung im Katalysemechanismus einnehmen. Zudem konnten fünf weitere hydrophobe Aminosäuren im N-terminalen Bereich identifiziert werden, deren Austausch mit Ausnahme von Pro₁₀₇ zum PLA-Aktivitätsverlust führte. Pro-Reste sind dafür bekannt, dass ihr Austausch zu strukturellen Veränderungen im Protein führen kann (Watanabe *et al.*, 1997), was die reduzierte PLA-Aktivität erklären könnte.

Phospholipasen präferieren polare Phospholipide als Substrate, was ebenso für PlaB zutrifft (Bender *et al.*, 2009, Flieger *et al.*, 2004). Somit kann angenommen werden, dass auch das aktive Zentrum einen hydrophilen/polaren Charakter aufweist. Nahe dem katalytisch aktiven Ser₈₅ befindet sich Cys₈₁, welches zu den neu entdeckten Aminosäuren gehört. Die Substitution dieser einen polaren Aminosäure führte in diesem Fall zu einem vollkommenen Verlust der PLA-Aktivität, was seine Wichtigkeit für die enzymatische Aktivität widerspiegelt. Interessanterweise führte die Mutation der beiden Aminosäuren Ser₄₇ und Asp₅₀, welche in der Primärsequenz etwas entfernter vom Ser₈₅ liegen und innerhalb der Proteinsequenz der PlaB-Homologen hoch konserviert sind, zur Änderung der Substratspezifität. Das glyzerinhaltige Phospholipid PG konnte noch zu mehr als 50% hydrolysiert werden, wohingegen das korrespondierende cholinhaltige Substrat nicht mehr umgesetzt werden konnte. Gleiches zeigte sich für Asn₁₉₃, welches sich nahe dem katalytisch aktiven Asp₂₀₃ befindet (Abb. 3.5). Die Mutation der zwei polaren Aminosäurereste Glu₁₅₂ und Asn₂₁₂, welche in der Primärsequenz etwas entfernter vom Asp₂₀₃ liegen, verursachte einen nahezu vollständigen Verlust der PLA-Aktivität. Diese polaren

Aminosäuren des N-terminalen Bereiches spielen demnach eine essentielle Rolle hinsichtlich der Substratspezifität/-bindung bzw. bei der Unterstützung der Katalyse.

Innerhalb des C-Terminus von PlaB wurden neun Aminosäuren entdeckt, deren Mutation zum Verlust des hämolytischen Potentials führte und die innerhalb der PlaB-Homologen zum Teil konserviert vorliegen. Sechs der neun Aminosäuren besitzen eine polare Seitenkette. Es lässt sich auch bezüglich dieser Punktmutationen feststellen, dass der Austausch zu einer Änderung in der Substratumsetzung bzw. zu einer Änderung der Substratspezifität führt. Im Gegensatz zum Austausch von Asp₃₃₄ und Ser₃₂₆, der zu einem Verlust der PLA-Aktivität führte, wurde bei den vier anderen betroffenen polaren Aminosäuren (Glu₃₀₆, Asp₃₄₂, Asp₃₆₅, Asp₃₈₁) neben dem PC-abhängigen PLA-Aktivitätsverlust eine reduzierte PG-abhängige PLA-Aktivität festgestellt (Abb. 3.5). Bezüglich Ser₃₂₆ ist nicht auszuschließen, dass die Ser₃₂₆Pro-Mutation die Aktivität von PlaB aufgrund möglicher struktureller Veränderungen im Protein beeinflusst hat.

Zusammenfassend wurden 22 neue Aminosäuren identifiziert, deren Mutation die PLA-Aktivität von PlaB beeinflusst. Inwiefern und auf welche Weise diese Aminosäuren an der Katalyse und der Substratbindung beteiligt sind, kann nicht ohne die Aufklärung der Kristallstruktur diskutiert werden. Zudem kann eine Fehlfaltung einzelner mutierter Proteine nicht ausgeschlossen werden, was mittels CD-Spektroskopie der gereinigten PlaB-Varianten überprüft werden müsste.

4.3 Der Einfluss oligomerer Zustände von PlaB auf die enzymatische Aktivität

Für eine Reihe von Phospholipasen, z.B. der *outer membrane phospholipase A* (OMPLA) aus *E. coli* oder Phospholipasen C (PLC) aus *Bacillus thuringensis*, *Staphylococcus aureus* oder *Trypanosoma brucei*, stellt die Oligomerisierung einen wichtigen Mechanismus zur Enzymaktivierung dar (Armah & Mensa-Wilmot, 2000, Dekker *et al.*, 1997, Cheng *et al.*, 2012, Shi *et al.*, 2009, Snijder *et al.*, 1999). Da es bisher noch keine Informationen und Hinweise zu PlaB gab, wurde diese PLA im Rahmen der vorliegenden Arbeit bezüglich ihrer Fähigkeit zur Oligomerisierung mit verschiedenen Methoden untersucht. Die analytische SEC mit 1 mg/ml gereinigtem Strep-PlaB resultierte in einem diskreten Elutionspeak, der einem apparenten Molekulargewicht (MG) von ~110 kDa entspricht. Da das von der Aminosäuresequenz von Strep-PlaB kalkulierte MG 55,3 kDa beträgt, deutet die SEC-Analyse auf die Bildung eines PlaB-Homodimers hin (Abb. 3.11). Die Fähigkeit von PlaB zur Ausbildung eines Dimers konnte zudem mittels chemischer Quervernetzung mit PFA von 1 mg/ml aus *E. coli* BL21 gereinigtem Strep-PlaB bzw. aus *L. pneumophila plaB1* gereinigtem PlaB-Strep gezeigt werden (Abb. 3.12). Interessanterweise wurde im Western Blot neben der Bande in Höhe von 110 kDa, die dem PlaB-Dimer zuzuordnen ist, eine weitere Bande in Höhe von ~165 kDa detektiert. Diese Größe würde mit einem PlaB-Homotrimer korrespondieren. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass PlaB mit

einem unbekannten Protein vernetzt wurde, das bei der affinitätschromatographischen Reinigung des rekombinanten Proteins nicht abgetrennt werden konnte (vergleiche mit Abb. 3.9). Diese Bande tritt zudem erst bei höheren PFA-Konzentrationen und längerer Inkubationszeit mit PFA auf, was die Wahrscheinlichkeit der unspezifischen Verknüpfung erhöht. Aus der Literatur ist bekannt, dass diese zwei Parameter eine kritische Rolle für die Quervernetzung mit PFA spielen. Es zeigte sich, dass eine Inkubationszeit im Minutenbereich und niedrige PFA-Konzentrationen empfehlenswert sind (Klockenbusch & Kast, 2010). Unter diesen Bedingungen wurde für PlaB hauptsächlich die Bande in Höhe von 110 kDa, dem Homodimer entsprechend, detektiert (Abb. 3.12). Die massenspektrometrische Analyse von PlaB-Strep, eine Methode zur konkreten Bestimmung des MG komplexer biologischer Makromoleküle, zeigte interessanterweise vier Hauptsignale. Neben der Detektion eines Homodimers und des Monomers von PlaB-Strep, trat ein Signal korrespondierend zu einem Homotetramer bei ~222 kDa auf (Abb. 3.13). Daneben wurde ebenso ein Signal bei ~167 kDa detektiert, welches der Größe nach einem Homotrimer von PlaB-Strep zugeordnet werden kann. Da jedoch die Signalstärke geringer ist, als die des nachfolgenden Tetramerpeaks, deutet es eher darauf hin, dass das Trimer während des Laserbeschusses der Probe artifiziell entstanden ist. Diese Hypothese konnte mittels der analytischen Ultrazentrifugation (AUZ) verifiziert werden. Die Sedimentations-Geschwindigkeitszentrifugations (SV)-Analyse des gereinigten Strep-PlaB bestätigte dabei die Zusammenlagerung von PlaB sowohl zu einem Homodimer als auch zu einem Homotetramer. Die Ausbildung eines Homotrimers konnte mit dieser Methode ausgeschlossen werden. Mit Hilfe der Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS) konnte zudem die Zusammenlagerung von PlaB zu einem Homotetramer bei einer Konzentration von 1 mg/ml bestätigt werden. Die Berechnung eines *ab initio* Modells von PlaB zeigte, dass sich das Homotetramer aus zwei Dimeren mit einer D₂-Symmetrie assembliert. Die verschiedenen Methoden zur Bestimmung des Oligomerisierungsgrades von PlaB führen eindeutig zu der Erkenntnis, dass PlaB die Fähigkeit zur Ausbildung eines Homodimers aber auch zu der eines Homotetramers besitzt. Zudem zeigten die SAXS-Analysen mit den C-terminal verkürzten Varianten von Strep-PlaB, dass die letzten 15 Aminosäuren für die Ausbildung eines Tetramers bei der gemessenen Konzentration von 1 mg/ml entbehrlich sind (Abb. 3.16).

Es stellte sich die Frage, ob die Oligomerisierung für die Enzymaktivierung bzw. -aktivität von Bedeutung ist, wie es für *E. coli* OMPLA beschrieben wurde. Die OMPLA-Monomere lagern sich dabei mit ihrer flachen Seite der beta-Fass-Strukturen zu einem reversiblen Dimer zusammen was folglich zur Aktivierung des Enzyms führt (Dekker *et al.*, 1997, Snijder *et al.*, 1999). Obwohl PlaB keine signifikante Homologie zu OMPLA aufweist und es ebenso keine Anzeichen für die Ausbildung von beta-Fass-Strukturen gibt, könnte dieser Aktivierungsmechanismus ebenso auf

PlaB zutreffen. Mit Hilfe der AUZ stellte sich heraus, dass sich PlaB in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration zu einem Dimer oder Tetramer assembliert. Dieses Dimer-Tetramer-Gleichgewicht wurde bei Proteinkonzentrationen im mikromolaren Bereich beobachtet. Bei Konzentrationen zwischen 18,6 μM (1 mg/ml) und 5,4 μM (0,3 mg/ml) assembliert PlaB zu einem Tetramer (Abb. 4.2), was ebenfalls durch SAXS-Analyse bestätigt werden konnte. Allerdings weichen die Ergebnisse der SEC und der chemischen Quervernetzung mit 1 mg/ml Protein von den SAXS- und AUZ-Daten ab. Der Elutionspeak der SEC entsprach der Größe nach einem Dimer. Eine mögliche Ursache könnte die Verdünnung der Proteinkonzentration auf der Superdex 200 Säule sein. Zudem ist nicht auszuschließen, dass das deutlich von der Kugelform abweichende Tetramer aufgrund des hydrodynamischen Volumens ein anderes Laufverhalten zeigt und somit der Elutionspeak nicht mit dem Oligomerisierungsgrad von PlaB korreliert. Unspezifische Wechselwirkungen des Proteins mit der Säulenmatrix könnten ebenfalls zu einer verzögerten Elution des Proteinkomplexes führen. Das Fehlen einer Bande im tetrameren Bereich von PlaB bezüglich der Quervernetzungsexperimente mit PFA könnte darauf zurückgeführt werden, dass PFA als eines der kleinsten Vernetzungsmoleküle nur nahe beieinander gelegene Monomere, demnach also nur die Dimere, kovalent verknüpfte (vergleiche mit dem *ab initio* Modell, Abb. 3.15).

Das ausgebildete Dimer-Tetramer-Gleichgewicht im mikromolaren Bereich verschiebt sich laut AUZ bei einer Proteinkonzentration von 0,13 μM (0,007 mg/ml) fast vollständig auf die Seite des Dimers. Im Konzentrationsbereich des Tetramers ($>5,4 \mu\text{M}$ bzw. 0,3 mg/ml) wurde keine signifikante phospholipolytische Aktivität detektiert (Abb. 3.17). Eine Verringerung der PlaB-Konzentration unterhalb von 5,4 μM , welche zur Dissoziation des Tetramers führte, resultierte in einem Anstieg der katalytischen Enzymaktivität. Bezogen auf die Enzymmenge ist in diesem Bereich keine signifikante spezifische Aktivität detektiert worden. Obwohl das Gleichgewicht unterhalb von 0,13 μM schon auf die Seite des Dimers verlagert ist, nimmt die spezifische Aktivität mit sinkender Proteinkonzentration kontinuierlich zu (Abb. 3.17). Das lässt vermuten, dass das PlaB-Dimer nicht die vorherrschende aktive Form des Enzyms darstellt, sondern, im Gegensatz zu OMPLA, das Monomer. Die AUZ-Analysen von Strep-PlaB wurden bis zu einer minimalen Proteinkonzentration von 0,13 μM durchgeführt. Bis zu dieser Konzentration wurde die monomere Form von Strep-PlaB nicht erfasst. Erst die Fluoreszenzmarkierung des gereinigten Proteins ermöglichte die Detektion im nanomolaren Bereich, wobei das Monomer erfasst werden konnte (Abb. 3.18). PlaB bildet demnach ein konzentrationsabhängiges Monomer-Dimer-Tetramer-Gleichgewicht aus (Abb. 4.2). Mit den in dieser Arbeit angewandten Methoden war es nicht möglich, den genauen Konzentrationsbereich zu bestimmen, bei dem das Dimer zu einem Monomer dissoziiert. Die Fluoreszenzmarkierung beeinflusst vermutlich den

Oligomerisierungsgrad von PlaB. Die reduzierende SDS-PAGE mit anschließendem α -PlaB Western Blot bestärkt die Hypothese, dass durch die unspezifische Markierung der Aminogruppen von gereinigtem Strep-PlaB die Monomere und Dimere zu einem geringen Teil kovalent verknüpft wurden (Abb. 3.18 C). Demnach ist das fluoreszenzmarkierte Strep-PlaB für eine quantitative Analyse der Oligomerisierung nicht geeignet. Anhand der Fluoreszenzmessungen konnte dennoch das Auftreten des PlaB-Monomers im nanomolaren Bereich, in welchem das Enzym eine hohe spezifische Aktivität aufweist, bestätigt werden.

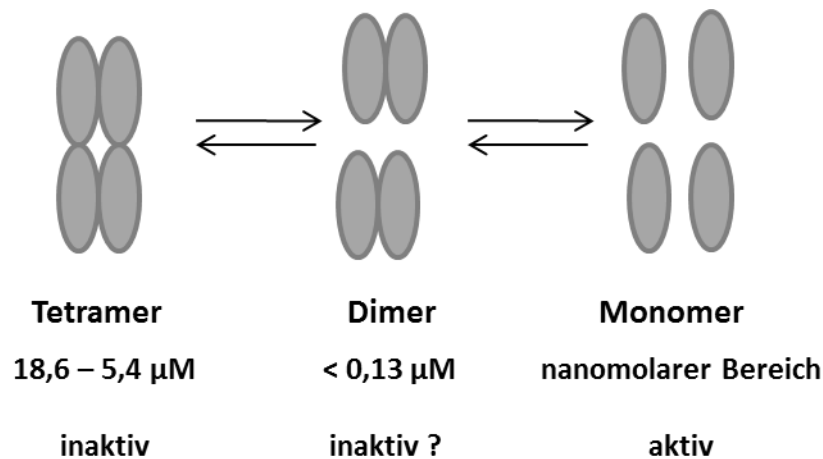


Abb. 4.2: Schematische Darstellung des Einflusses der Proteinkonzentration auf den Oligomerisierungsgrad und die damit verbundene enzymatische Aktivität von PlaB. PlaB liegt bei einer Konzentration von $>5,4 \mu\text{M}$ als inaktive, tetramere Form vor. Beim Absinken der Konzentration unterhalb von $0,13 \mu\text{M}$ dissoziiert das Tetramer fast vollständig zu Dimeren. Das Monomer und somit die Form des Enzyms mit der höchsten spezifischen Aktivität tritt erst im nanomolaren Konzentrationsbereich auf.

Zusammengefasst deuten die hier gewonnenen Daten darauf hin, dass das Monomer die aktive Enzymform von PlaB darstellt und die Assemblierung der Monomere bis hin zum Tetramer zur Inaktivierung der phospholipolytischen Aktivität führt. Anders ausgedrückt, die Dissoziation der enzymatisch inaktiven tetrameren Form von PlaB führt zur Aktivierung der PLA/LPLA.

Ein vergleichbarer Regulationsmechanismus zur Aktivierung einer Phospholipase wurde bisher noch nicht beschrieben. Es sind viele Beispiele für Enzymaktivierungen aufgrund von Oligomerisierung bekannt (Kosk-Kosicka & Bzdega, 1988, Kosk-Kosicka *et al.*, 1989, Dekker *et al.*, 1997, Snijder *et al.*, 1999, De Oliveira *et al.*, 2001, Marchi-Salvador *et al.*, 2008, Griffon *et al.*, 2009, Magro *et al.*, 2003, Cheng *et al.*, 2012). Jedoch sind nur sehr wenige Enzymbeispiele genannt, bei denen die Dissoziation die Aktivität des Enzyms in der Weise reguliert, dass die oligomere Form im Vergleich zur monomeren Form eine reduzierte Aktivität zeigt (Ropp & Traut, 1991, Traut, 1994, Beernink & Tolan, 1996, Sanchez *et al.*, 2001). Die Purin-Nukleosid-Phosphorylase (PNP) der Rindermilz z.B. wird normalerweise als stabiles Trimer *in vivo*

vorgefunden. Eine Verdünnung der Enzymkonzentration von 20 auf 0,02 µg/ml geht mit einem 50fachen Anstieg der Enzymaktivität einher. Es wurde geschlussfolgert, dass das PNP-Monomer die stärker aktive Form sein muss. Zudem wird die Aktivität durch die vorherrschende Phosphatkonzentration beeinflusst, welche ebenso die Oligomerisierung reguliert (Ropp & Traut, 1991, Traut, 1994). Ein weiteres Beispiel für die Aktivierung durch serielle Reduktion der Enzymmenge stellt eine PLA₂ aus der Texas-Klapperschlange *Crotalus atrox* dar. Verdünnungsexperimente zeigten in diesem Fall, dass die sekretierte PLA₂, im Gegensatz zu PlaB, ein sehr festes Dimer ausbildet. Die Daten aus der Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie (FCS) deuteten darauf hin, dass das Dimer nur bei Zugabe von n-Dodecylphosphocholin (C12-PN) dissoziierte. Es wurde postuliert, dass eine intermediäre Form gebildet wird, bei der die zwei Monomere eine lockere Interaktion innerhalb der Protein-Lipid-Ko-Mizelle ausbilden. Die komplette Dissoziation des Dimers wurde hier mit steigender C12-PN-Konzentration festgestellt. Es wurde geschlussfolgert, dass die dimere Form in Abwesenheit von Lipiden vorherrscht und eine Interaktion mit den Lipiden die Ausbildung der monomeren Form fördert, was wiederum die Monomer-Hypothese für die PLA₂-Aktivität bekräftigte (Sanchez *et al.*, 2001).

Im Gegensatz zur PLA₂ von *Crotalus atrox* benötigt PlaB keine Lipide zur Dissoziation in die monomere Form, aber auch keine anderen Substanzen, die die Oligomerisierung beeinflussen, wie die Phosphatkonzentration im Fall von PNP. Es ist aber nicht ausgeschlossen, dass durch die An- oder Abwesenheit von noch unbekannten Ko-Faktoren die Stabilität des Tetramers und somit die Dissoziation in die monomere Form verändert wird.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein neues Beispiel für die Enzymaktivierung bei Phospholipasen gezeigt werden, wobei mittels Enzymverdünnung die Dissoziation des inaktiven Tetramers zur aktiven monomeren Form führt. Ohne Kristallstruktur ist die Vorhersage der Struktur sowie der Oligomerisierungsregionen jedoch sehr schwierig, da PlaB das erste charakterisierte Mitglied einer neuen Lipasefamilie ist (Bender *et al.*, 2009). Röntgenstrukturanalysen könnten an dieser Stelle den genauen Mechanismus zur Inaktivierung durch Oligomerisierung und zudem die Interaktionsflächen der Monomere offenlegen.

4.4 Subzelluläre Lokalisation und Export des PlaB-Proteins

4.4.1 PlaB – ein peripheres Protein der äußeren Membran

Neben der zellulären Fraktionierung mittels Ultrazentrifugation wurden ebenso die Biotinylierung und die proteolytische Zugänglichkeit zelloberflächenassoziiierter Proteine mit anschließender immunologischer Proteindetektion als Methoden zur Lokalisierung von PlaB in *L. pneumophila* durchgeführt. Bei einem ersten Trennschritt der zytosolischen von der Membranfraktion aus dem *L. pneumophila* Wildtyp mittels Ultrazentrifugation zeigte sich, dass PlaB hauptsächlich in der

Membranfraktion vorkam (Abb. 3.21). Ein geringer Anteil konnte zudem in der zytosolischen Fraktion lokalisiert werden. Da *Legionella* ein Gram-negatives Bakterium ist, musste ein weiterer Trennschritt der Membranfraktion erfolgen, wobei zwischen der äußeren und inneren Membran diskriminiert wird. Dieser zweite Schritt wurde mit der *plaB*-exprimierenden Mutante (Komplementante) durchgeführt, da im Falle des Wildtyps die Signale im α -PlaB Western Blot nicht eindeutig detektiert werden konnten. Hierbei konnte PlaB sowohl in der inneren als auch in der äußeren Membranfraktion detektiert werden. Die jeweiligen Kontrollproteine LepB (innere Membran) und MOMP (äußere Membran), bestätigten eine effiziente Trennung der beiden Membranfraktionen (Vranckx *et al.*, 2007, Helbig *et al.*, 2007, High *et al.*, 1993, Gosting *et al.*, 1984, De Buck *et al.*, 2008). Daneben konnte PlaB, im Vergleich zum Wildtyp, in größerer Menge in der zytosolischen Fraktion lokalisiert werden. Das ist dadurch erklärbar, dass die Komplementante PlaB in größeren Mengen exprimiert, was schon während der Überprüfung des α -PlaB Antikörpers ersichtlich wurde (Abb. 3.10). Die Ergebnisse der zellulären Fraktionierung weichen im Vergleich zu den in der Vergangenheit gewonnenen Erkenntnissen aus der Sucrosedichtegradientenzentrifugation etwas ab. PlaB wurde hierbei indirekt über die Aktivität in der äußeren Membran lokalisiert (Schunder *et al.*, 2010). Da keine Western Blot Analyse durchgeführt werden konnte, ist es zudem möglich, dass ein Teil des Enzyms, der allerdings inaktiv ist, mittels Aktivitätsmessungen nicht erfasst werden konnte. Da im Rahmen dieser Arbeit mit der Komplementante gearbeitet wurde, muss ebenso in Betracht gezogen werden, dass durch die unnatürlich hohe PlaB-Quantität eine artifizielle Lokalisationsverteilung in Frage kommt. Mit Hilfe der Biotinylierungs- und Proteinase K-Experimente konnte gezeigt werden, dass PlaB auf der Oberfläche des *L. pneumophila* Wildtyps lokalisiert ist (Abb. 3.22 und 3.23). Diese Ergebnisse korrelieren mit vorherigen Lokalisationsstudien, die neben der Anwesenheit von PlaB in der äußeren Membran zudem die spezifische Lokalisation aufgrund der vorhandenen Aktivität auf der Zelloberfläche vermuten ließen (Schunder *et al.*, 2010). Die immunologische Proteindetektion konnte diesen Aspekt verifizieren.

Die hohe Zugänglichkeit von Proteinase K zu PlaB, jedoch nicht zu dem integralen äußeren Membranprotein MOMP (Gabay *et al.*, 1985), sowie das Fehlen transmembraner Domänen laut der Vorhersageprogramme HMMTOP, TMHMM und TMPred (s. 3.1.1) deuten auf eine nicht-integrale Assoziation von PlaB mit der äußeren Membran hin. Zudem weist PlaB keine Aminosäure-Homologie zu integralen Phospholipasen der äußeren Membran, wie z.B. zu dem bereits erwähnten Enzym OMPLA aus *E. coli*, auf (Flieger *et al.*, 2004, Snijder & Dijkstra, 2000). Singer und Nicolson definierten zwei Klassen von Membranproteinen. Neben den integralen Proteinen gibt es ebenso die peripheren bzw. extrinsischen Proteine, welche die Membran nicht zu einem signifikanten Anteil penetrieren, sondern aufgrund ionischer Wechselwirkungen und

Wasserstoffbrückenbindungen mit der Membran verbunden sind (Singer & Nicolson, 1972). Zudem besteht die Möglichkeit, über eine Interaktion mit anderen Membranproteinen oder mittels eines Lipidankers mit der Membran assoziiert zu sein (Kinnunen *et al.*, 1994, Sankaran & Wu, 1994, Chou & Elrod, 1999). Für PlaB als peripheres Protein der äußeren Membran, dessen genaue Form der Interaktion bisher noch ungeklärt ist, können folglich verschiedene Möglichkeiten für die Assoziation mit der bakteriellen Oberfläche in Frage kommen. Eine Interaktion mit einem anderen Membranprotein oder über hydrophobe, ionische bzw. elektrostatische Wechselwirkungen mit den Membranlipiden ist für PlaB vorstellbar. Ein schon bekanntes Beispielprotein für die Assoziation an der äußeren Membran über Protein-Protein-Wechselwirkung in *Legionella* ist das membranassoziierte DotH-Protein, eine Komponente des Dot/Icm Typ IVB-Sekretionssystems. In Abwesenheit von anderen Dot/Icm-Komponenten verliert DotH die Assoziation zur äußeren Membran (Vincent *et al.*, 2006, Nakano *et al.*, 2010). Mittels Pulldown-Experimenten könnten für PlaB mögliche Interaktionsproteine identifiziert werden, welche für eine periphere Verankerung zur äußeren Membran in Frage kommen. Erste Versuche zur Identifikation von Protein-Interaktionspartnern konnten allerdings noch kein potentiell Protein ausmachen. Eine Verankerung über Lipidreste (s. 3.1.1), welche z.B. für die zwei Lipoproteine DotD und DotC in *L. pneumophila* bekannt ist (Vincent *et al.*, 2006, Yerushalmi *et al.*, 2005), ist für PlaB aufgrund fehlender Hinweise auf die Existenz posttranslationaler Prenylierungen bzw. Lipidmodifikationen eher unwahrscheinlich.

4.4.2 PlaB-Export zur Bakterienoberfläche

Für *L. pneumophila* sind bisher das putative Protein-Sekretionssystem vom Typ I (Lss), verschiedene putative Typ IVA-Sekretionssysteme (LvH, Trb-1, Trb-2), ein putativer Typ V-Autotransporter sowie die zwei Sekretionsmaschinerien vom Typ II (Lsp) und Typ IVB (Dot/Icm) beschrieben worden (Cianciotto, 2014, Qiu & Luo, 2014, Albert-Weissenberger *et al.*, 2007, De Buck *et al.*, 2007, Brassinga *et al.*, 2003, Cazalet *et al.*, 2004, Glöckner *et al.*, 2008, Jacobi & Heuner, 2003, Schroeder *et al.*, 2010, Segal *et al.*, 1999). Des Weiteren existieren in *Legionella* sowohl der Proteinsekretionsweg Sec als auch Tat, die für den Transport über die innere Membran eine bedeutende Rolle spielen (De Buck *et al.*, 2004, De Buck *et al.*, 2005, Rossier & Cianciotto, 2005, Cazalet *et al.*, 2004, Chien *et al.*, 2004). Im Zuge dieser Arbeit wurden Bakterienzellen der *tatC*, *lssB* (T1SS), *lspDE* (T2SS), *lvh* (T4ASS), *dotA* (T4BSS), *dotB* (T4BSS), *dotB/lvh* (T4A/BSS) Sekretionsmutanten mittels Proteinase K-Degradation analysiert. Bei allen verfügbaren Sekretionsmutanten war PlaB für Proteinase K zugänglich (Abb. 3.25). Das spricht dafür, dass die Translokationseffizienz von PlaB bei den getesteten Sekretionsmutanten vom Typ I, II, IV und Tat nicht beeinflusst wurde und diese demnach entbehrlich für den Export und die

nachfolgende Exposition auf der Zelloberfläche von *L. pneumophila* sind. Die Resultate korrelieren zudem mit den in der Vergangenheit gezeigten Aktivitätsdaten bezüglich der gemessenen zellassoziierten PLA-Aktivität ganzer *L. pneumophila* Zellen mit einem Defekt im putativen T1SS, T2SS, T4BSS und im Tat-Sekretionsweg (Schunder *et al.*, 2010). Ferner gibt es in der Literatur keinen Hinweis über den Export von PlaB. Diese Phospholipase wurde weder unter den Typ IVB-sekretierten Effektoren identifiziert (Ensminger & Isberg, 2009, Hubber & Roy, 2010, Heidtman *et al.*, 2009, Segal *et al.*, 1998, Vogel *et al.*, 1998, Zhu *et al.*, 2011, Gomez-Valero *et al.*, 2011, Lifshitz *et al.*, 2013) noch bei den Typ II-abhängig sekretierten Proteinen detektiert (Cianciotto, 2014, Cianciotto, 2009, McCoy-Simandle *et al.*, 2011). Zudem weist PlaB kein putatives Signalpeptid für den Transport über die innere Membran auf (untersucht mit Hilfe der Vorhersageprogramme SignalP, Phobius, TatP, PrediSi). Die N-terminale Sequenzierung der ersten 20 Aminosäuren von aus *L. pneumophila* Corby *plaB1* (pKK43) gereinigtem PlaB-Strep konnte die bisher gewonnenen Erkenntnisse bestätigen. Es wurde nur der N-Terminus des Volllängenproteins detektiert, was vermuten lässt, dass sowohl der Sec- als auch der Tat-abhängige Transportweg für PlaB keine Rolle spielen.

Um Hinweise auf wichtige Proteinregionen zur Translokation zu erhalten, wurden des Weiteren C- und N-terminal verkürzte PlaB-Varianten auf ihre Fähigkeit zum Export auf die Oberfläche von *L. pneumophila* hin untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass mit zunehmender N- und/oder C-terminaler Verkürzung die Zugänglichkeit für Proteinase K abnahm (Abb. 3.28). Folglich wurde die Translokationseffizienz von PlaB durch diese Verkürzungen negativ beeinflusst. Besonders die N-terminale Trunkierung um 50 Aminosäuren sowie die C-terminalen Verkürzungen um ~170 und 150 Aminosäuren zeigten eine signifikante Veränderung im Vergleich zum Volllängenprotein. Dies lässt vermuten, dass verschiedene Proteinregionen, besonders der Bereich zwischen der 21. und 51. sowie der 303. und 323. Aminosäure, die Effizienz der PlaB-Translokation erhöhen. Das Fehlen beider Regionen führte nicht zu einem additiven Effekt und somit nicht zu einem weiteren Verlust der Translokationseffizienz. Zudem reicht der C-Terminus allein nicht für die Translokation von PlaB aus, da die alleinige Expression dieser Region nicht zur Präsentation auf der Oberfläche des Bakteriums ausreichte. Diese Beobachtungen implizieren, dass eine Kombination von mindestens zwei Proteinregionen, welche sowohl im N- als auch im C-terminalen Bereich vorkommen, zur Translokation auf die Oberfläche von *L. pneumophila* beitragen.

Die Resultate der Translokationseffizienz der verkürzten PlaB-Varianten stehen im Einklang mit denen der Sekretionsmutanten. Über den Export des Dot/Icm Typ IVB- bzw. des Typ I-Sekretionssystems ist bekannt, dass Proteinregionen innerhalb der C-terminalen Domäne für die Translokation in die Wirtszelle essentiell sind. In *Legionella* wurde bisher noch kein Typ I-

abhängiges Protein als Substrat identifiziert. Von anderen Gram-negativen Bakterien ist jedoch bekannt, dass in Typ I-sekretierten Proteinen ein C-terminales Motiv, bestehend aus einem negativ geladenen Aminosäurerest gefolgt von hydrophoben Aminosäuren, konserviert vorliegt (Kuwahara *et al.*, 2011). Zudem ist für die Typ I-abhängige Sekretion ein hydrophobes Sequenzmotiv (Val-Thr-Leu-Ile-Gly) vor dem eben erwähnten Motiv des C-Terminus ebenso wichtig (Omori *et al.*, 2001). Das Sekretionssignal für Dot/Icm-Effektoren ist im Gegensatz dazu für *L. pneumophila* sehr gut untersucht. Es besteht aus keiner spezifischen Aminosäuresequenz, sondern aus Aminosäuren innerhalb der letzten 35 C-terminalen Positionen des Effektors mit ähnlichen physikochemischen Eigenschaften. Es kristallisierte sich heraus, dass ein langer Glu-Abschnitt (E-Block) an Position -10 bis -17 und verschiedene hydrophobe Aminosäurereste am C-terminalen Ende für die Translokation essentiell sind (Lifshitz *et al.*, 2013, Huang *et al.*, 2011, Burstein *et al.*, 2009, Kubori *et al.*, 2008). Für PlaB konnte keine Ähnlichkeit zu schon bekannten C-terminalen Sekretionssignalen identifiziert werden. Des Weiteren zeigten die C-terminal um 50 bzw. 100 Aminosäuren verkürzten PlaB-Mutanten keine Veränderung in der Translokationseffizienz. Zudem verhielt sich die N-terminal um 20 Aminosäuren verkürzte PlaB-Mutante wie das Volllängenprotein, was mit dem Ergebnis der N-terminalen Sequenzierung korreliert. Für einen Tat- bzw. Sec-abhängigen Transport wäre ein gegenteiliges Resultat erwartet worden. Somit ist auch die Sekretion über das T2SS und das T5SS eher unwahrscheinlich.

Es bleibt die Frage, auf welche Art und Weise PlaB zur äußeren Membran exportiert wird. Es ist denkbar, dass PlaB auf einem von den untersuchten Sekretionssystemen unabhängigen Weg zur äußeren Membran gebracht wird. Höchstwahrscheinlich sind noch nicht alle in *L. pneumophila* vorkommenden Sekretionssysteme und -wege bekannt. In der Literatur sind bakterielle Proteine beschrieben, die ohne ersichtliches Signalpeptid oder andere konservierte Motive sekretiert werden und demnach unter das als „nicht-klassische Sekretion“ bezeichnete Phänomen fallen. Die Mechanismen für die nicht-klassische Sekretion sind jedoch noch unbekannt (Bendtsen *et al.*, 2005).

Die bekannten Typ IVB-injizierten *L. pneumophila* Phospholipasen VipD, VpdA, VpdB, VpdC sowie PlcC (CegC1) weisen, wie auch PlaB, neben der katalytischen Domäne im N-Terminus eine C-terminale Verlängerung auf (s. Abb. 3.1). Zudem wird die Dot/Icm-abhängige Translokation als Wirtszell-kontaktabhängig beschrieben (Kirby *et al.*, 1998, Roy *et al.*, 1998). Es kann somit nicht ganz ausgeschlossen werden, dass PlaB doch den Typ IVB-sekretierten Effektoren zuzuordnen ist, obwohl kein offensichtliches C-terminales Erkennungsmotiv identifiziert wurde. CyaA-Translokationsexperimente mit verschiedenen Typ IVB-Sekretionsmutanten könnten PlaB als Effektorprotein unter Infektionsbedingungen bestätigen

oder die bisherigen Ergebnisse bezüglich der Typ IVB-Sekretion widerlegen (Burstein *et al.*, 2009, Sutherland *et al.*, 2012).

Laut der Gruppe um G. Segal existiert eine dritte Kategorie von Effektorproteinen, die hauptsächlich den IcmS-IcmW-Chaperonkomplex für die Translokation nutzen. Diese Effektoren könnten ein bis dato noch unbekanntes Signalpeptid enthalten. Die Glucosyltransferase Lgt1, ein Effektor ohne C-terminales Sekretionssignal, wurde in dieser Studie experimentell als IcmS-IcmW-abhängig translozierter Effektor bestätigt (Lifshitz *et al.*, 2013).

4.5 Bedeutung von PlaB für das Bakterium

Frühere Studien zeigten, dass das *plaB*-Transkript hauptsächlich in der exponentiellen Phase auftrat (Schunder *et al.*, 2010). Darüber hinaus zeigte sich im Rahmen dieser Arbeit, dass das Protein hauptsächlich in der stationären Wachstumsphase vorkommt (s. Abb. 3.19), welche der transmissiven Phase im biphasischen Lebenszyklus während einer Wirtzellinfektion entspricht (Abb. 1.1). Zudem wurde die PlaB-spezifische PLA/LPLA-Aktivität besonders in dieser späteren Wachstumsphase detektiert. Diese Beobachtungen korrelieren mit den Daten des *in vivo* Infektionsmodells, bei welchem nach zweitägiger Infektion die Ausbreitung der *plaB*-Mutante in die Milz im Vergleich zum *L. pneumophila* Wildtyp nahezu vollständig ausblieb. Die histopathologischen Analysen der Lunge zeigten zudem Gewebeerstörungen, die auf die PLA-Aktivität von PlaB zurückgeführt wurden (Schunder *et al.*, 2010).

4.5.1 Einfluss von PlaB auf Membranzusammensetzung von *L. pneumophila*

Neben der Beeinflussung der Wirtszelle können Phospholipasen zudem die Beschaffenheit der eigenen Membran beeinflussen, um sich an veränderte Umweltbedingungen bzw. spezifische Wachstumsphasen anzupassen. *L. pneumophila* aus der stationären Wachstumsphase sind resistenter gegenüber verschiedenen Antibiotika und Bioziden. Der Grund für die Ausbildung dieser Resistenz ist dagegen noch wenig verstanden (Garduno *et al.*, 2002, Hales & Shuman, 1999*, Barker *et al.*, 1992, Barker *et al.*, 1995, Donlan *et al.*, 2005). Erst kürzlich wurde gezeigt, dass die Wachstumsphase von *L. pneumophila* einen wichtigen Einfluss auf die Sensitivität gegenüber dem membranaktiven Peptid Warnericin RK hat. Exponentiell gewachsene Bakterien reagierten im Vergleich zu den stationär gewachsenen sensitiver auf diese Substanz (Verdon *et al.*, 2008). Die Gruppe um Y. Hechard analysierte die Fettsäurezusammensetzung der *L. pneumophila*-Membran unter verschiedenen Bedingungen, wobei unter anderem auch die zwei Wachstumsphasen verglichen wurden. Es stellte sich heraus, dass Bakterien aus der exponentiellen Wachstumsphase im Vergleich zu den Bakterien aus der stationären

Wachstumsphase ein verändertes Fettsäureprofil aufwiesen (Verdon *et al.*, 2008, Verdon *et al.*, 2011). Interessanterweise sinkt in der stationären Phase die Durchschnittslänge der Fettsäuren der Phospholipid-Moleküle im Vergleich zur exponentiellen Wachstumsphase. Diese Veränderungen in der Fettsäurezusammensetzung führen zu einer gesteigerten Toleranz gegenüber dem antimikrobiellen Peptid (Verdon *et al.*, 2011). Es wäre denkbar, dass PlaB eine wichtige Rolle bezüglich der veränderten Membranbeschaffenheit während des Wachstumszyklus‘ spielt, da diese PLA hauptsächlich langkettige Fettsäure-Substrate hydrolysiert (Bender *et al.*, 2009). Im Rahmen dieser Arbeit stellte sich heraus, dass die Aktivität von PlaB keinen Einfluss auf die veränderte Fettsäurezusammensetzung hat, was mit vorangegangenen FT-IR-Analysen stimmig ist (Bender, 2009*). Es wurden sowohl beim *L. pneumophila* Wildtyp als auch bei der *plaB*-Mutante diese schon von Verdon *et al.* bekannten Veränderungen während der Wachstumsphasen ermittelt. Zudem ist die Zusammensetzung der polaren Membranlipide unabhängig von der Aktivität von PlaB. Die Dünnschichtchromatographien zeigen zwar einen Unterschied zwischen den Wachstumsphasen (Abb. 3.30), welcher jedoch nicht von PlaB beeinflusst wird. Demnach ist PlaB an der veränderten Zusammensetzung der Membranlipide von *L. pneumophila* unter den gegebenen Bedingungen nicht beteiligt.

Die Ergebnisse zeigen eher, dass PlaB mittels seiner hydrolytischen Eigenschaften die Wirtszelle beeinflusst, was schon in vorherigen Arbeiten spekuliert (Bender *et al.*, 2009) und demonstriert (Schunder *et al.*, 2010) wurde. Diesbezüglich könnten Lipidom-Analysen isolierter Phagosomen von mit *L. pneumophila* Wildtyp und *plaB*-Mutante infizierten Wirtszellen Aufschluss über einen möglichen Beitrag von PlaB zur Membranveränderung im Wirt geben. Zudem könnten Pulldown-Analysen von Strep-gekoppeltem PlaB und *Legionella*-Lysaten sowie Wirtszelllysaten mögliche Interaktionspartner identifizieren, die zur Aufklärung der Funktionen von PlaB beitragen.

4.5.2 Modellvorstellung zur Aktivität von PlaB in *L. pneumophila*

PlaB besitzt eine hohe spezifische Aktivität (s. 4.2). Eine Akkumulation einer solch aktiven Phospholipase im Zytoplasma von *L. pneumophila* könnte sich nachteilig für das Bakterium selbst auswirken. Daher ist die Inaktivierung des eigenen Enzyms im Zytoplasma ein wichtiger Schutzmechanismus, um die Integrität der bakteriellen Membranlipide zu bewahren. Eine präzise Regulierung der Enzymaktivität wurde bereits für die zu Beginn erwähnte GDSE-Hydrolase PlaC in *L. pneumophila* beschrieben (Lang *et al.*, 2012). Es wurde gezeigt, dass diese PLA mit Acyltransferaseaktivität durch die *L. pneumophila* Zink-Metalloproteinase ProA aktiviert wird. ProA spaltet nach erfolgter Typ II-abhängiger Sekretion beider Enzyme eine Disulfid-Schleife von PlaC. Dieser Prozessierungsschritt führt zur Aktivierung von PlaC im extrazellulären Raum (Lang *et al.*, 2012). Eine proteolytische Aktivierung dieser Art kommt für PlaB nicht in Frage, da

gezeigt werden konnte, dass PlaB von ProA degradiert wird (Abb. 3.24 und 3.25). Zudem ist rekombinant exprimiertes und gereinigtes PlaB auch ohne Zugabe von weiteren Faktoren enzymatisch aktiv (s. 4.3). Es muss daher ein anderer Mechanismus existieren, der PlaB zum passenden Zeitpunkt aktiviert.

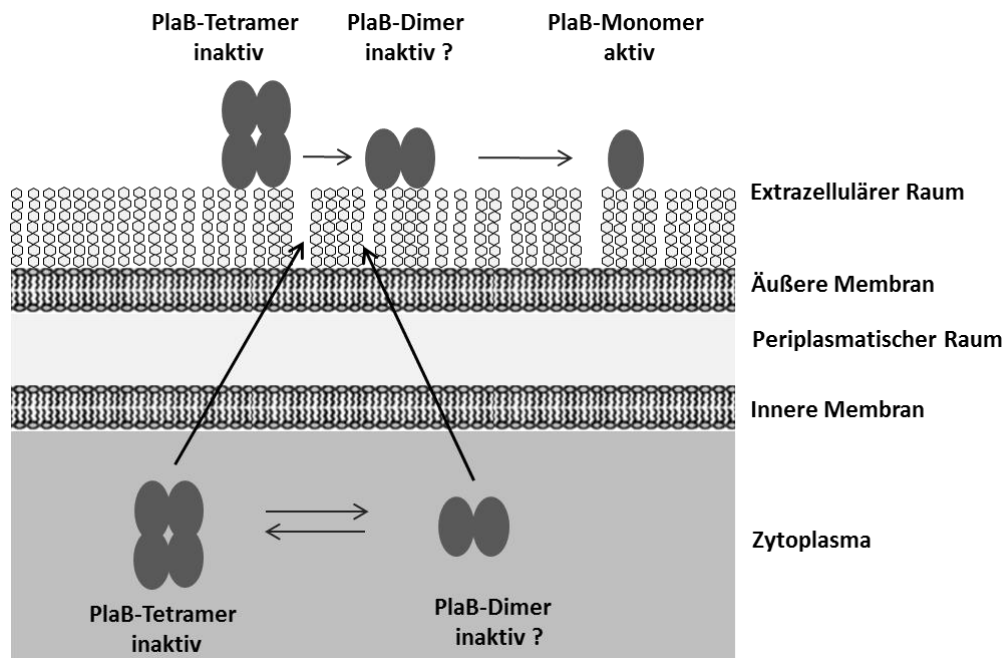


Abb. 4.3: Modellvorstellung über den Wirkmechanismus von PlaB in *L. pneumophila*. Anhand von den im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Aktivitäts- und strukturellen Ergebnissen wurde für PlaB folgendes Modell für den Wirkmechanismus in *L. pneumophila* entwickelt. Im Zytoplasma existiert PlaB nach der Biosynthese in Abhängigkeit von der Konzentration als inaktives Tetramer oder Dimer. Nach dem Export auf die Zelloberfläche, welcher noch nicht vollständig verstanden ist, dissoziiert PlaB in die aktive Form (PlaB-Monomer).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Tetramerisierung von PlaB zur Inaktivität und die Dissoziation bis hin zum Monomer zur Aktivierung des Enzyms führt (Abb. 4.2). Strukturelle Analysen deckten auf, dass PlaB ein konzentrationsabhängiges Monomer-Dimer-Tetramer-Gleichgewicht ausbildet, welches die Aktivität von PlaB reguliert (s. 4.3). Dieser Regulierungsmechanismus ist für PlaB *in vivo* denkbar. Die Kalkulation der zellulären Konzentration von PlaB mittels Western Blot Analyse ergab $\sim 0,35 \mu\text{M}$ pro *L. pneumophila* Zelle, was etwa 64 Molekülen entspricht (Abb. 3.20). Bei dieser Konzentration wurde kaum spezifische Aktivität detektiert. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass die Bestimmung der PlaB-Konzentration mittels einer semiquantitativen Methode durchgeführt wurde. Es ist anzunehmen, dass die wirkliche PlaB-Konzentration pro *L. pneumophila* Zelle noch viel geringer ist. Die Annahme und Berücksichtigung des sogenannten *macromolecular crowding* Effektes unterstützt jedoch die Hypothese des Vorkommens der inaktiven tetrameren Form im Zytoplasma von *L.*

pneumophila (Abb. 4.3). Unter *macromolecular crowding* wird die hohe Konzentration an Makromolekülen wie z.B. Proteinen im Zytoplasma einer Zelle verstanden, wodurch das Volumen des Lösungsmittels für andere Moleküle reduziert wird. Dieser *crowding*-Effekt kann somit biochemische Prozesse in der Zelle beeinflussen, wie z.B. die Zusammenlagerung makromolekularer Strukturen, Proteinfaltung und Protein-Protein-Interaktionen (Ellis, 2001, Chebotareva *et al.*, 2004, Zhou *et al.*, 2008, Zhou *et al.*, 2006).

Bisher erzielte Ergebnisse lassen über den Wirkmechanismus von PlaB in *L. pneumophila* die folgende Modellvorstellung vermuten (siehe Abb. 4.3). Demzufolge oligomerisiert PlaB nach der Biosynthese rasch und liegt dann in Form eines enzymatisch inaktiven Komplexes innerhalb der Zelle vor. Nach dem Export auf die Bakterienoberfläche dissoziiert PlaB vermutlich aufgrund der geringeren Konzentration in die aktive Form. Allerdings ist die Art und Weise der Translokation, die Assoziation auf der Zelloberfläche sowie die Verteilung von PlaB innerhalb von *L. pneumophila* noch nicht vollständig verstanden. Als aktives Enzym an der äußeren Membran ist PlaB so in der Lage Veränderungen an der Wirtsmembran vorzunehmen. Möglicherweise beeinflusst PlaB auf diesem Wege auch die Immunantwort der Wirtszelle. Wie im *in vivo* Infektionsmodell mit dem *Legionella*-Wildtyp beobachtet wurde, konnte die *plaB*-Mutante, im Vergleich zu Wildtyp *Legionellen*, Makrophagen nur vermindert rekrutieren. Dieses könnte z.B. durch die Generierung von sekundären Botenstoffen, wie LPC, verursacht werden (Kuhle & Flieger, 2014, Schunder *et al.*, 2010). Des Weiteren ist für PlaB die Zerstörung des Lungensurfactants denkbar, da diese PLA vorzugsweise PG und PC hydrolysiert (Bender *et al.*, 2009, Flieger *et al.*, 2004). Diese beiden Phospholipide machen den höchsten Anteil im Lungensurfactant aus (Postle *et al.*, 2001). Das könnte den besseren Zugang des *Legionella*-Wildtyps zu den alveolaren Makrophagen und somit die verbesserte Replikation erklären (Schunder *et al.*, 2010).

Die Aufklärung der Kristallstruktur von PlaB würde zudem die genetisch erworbenen und biochemisch beschriebenen Daten katalytisch wichtiger Aminosäurereste verifizieren und wichtige Informationen über die Interaktion zwischen PlaB und seinen Substraten sowie damit verbundene wertvolle Informationen für die Entwicklung von Medikamenten geben. Die Identifikation von Interaktionspartnern könnte überdies zum besseren Verständnis molekularer Prozesse während eines Infektionszyklus von *L. pneumophila* beitragen und biologische Funktionen von PlaB entschlüsseln.

Anhang

L.pneu	-----MIVIFVHGWSVTHNTNTYGELPQWLENQSKQGKLDI	35
L.spir	-----MIVIFLHGWSVTHNTNTYDALPLWLESIGKDGKLDI	35
L.dran	MLLNNLISSISTMPCCSAKKLRSMIVIFVHGWSVTHNTNTYGDLPKWLENQSKDETLDI	60
P.ing	-----MLVIFIHGWSVVDTSAYGLLPEALAEQADQYKLLKI	35
D.acet	-----MRLIFVHGWSVTNTDTYQQLPEALQAASADYDLSL	35
S.peal	-----MELVFVHGWSVTHNTDTYAQLPQALVKLLGD-ELNL	34
M.algi	-----MTIGLGGTMLIIHGWSD-GASSFKSLARKLTSPGPDRLYSS	41
P.aeru	-----MPR-----SIVIVHGWS-DSKSFRLAEQLEA-----WFGS	31
P.mari	-----MKEITLILHGWS-CSESFKDVKAFLIKNGIG-----	31
	:::**** :.: : *	
L.pneu	QVGNIIYLGRYISFDDTVTVDDIARAFDQAVRDE--IADKL RDGQRFACITHSTGGPIVRK	93
L.spir	QVGNIIYLGRYISFDDTVTVDDIARAFDHAVRDD--IADKLQDGERFACITHSTGGPIVRK	93
L.dran	LVGNIIYLGHYISFDDTITVDDIARAFDQAVRDE--IADKL RDGARFACITHSTGGLVVRK	118
P.ing	EIKHIWLGRYISFNDEVSADVARAFHDALHDQ--IPNGVGGIADFSCITHSTGGPVVRE	93
D.acet	DLHHIYLGRYISFHDDEVTLDDIARGLHQALHD---LPDNADQIQPFSCITHSTGGPVVRY	92
S.peal	TIRHIHLGRYISFDDAVRLSDIAKAFNDAHLEL--LGK-----KPFVITHSTGAAVIRH	87
M.algi	EIRHLRLADYISLDDEIGYDDLVEAMQRAWIKE--ELPTAP--RSVDVIIHSTGGLVVRH	97
P.aeru	APTQIRLADWVSLQDDVTYADLATALDRAWTAS--GLSRAP--RSVDVVVHSAGALVLRD	87
P.mari	SVDTIYYADYESREDNVTYEDVIDGLYDRFREKGFIDKEGNKLVDLNVIVHSTGGLVIRH	91
	: . : * . * : * : . : . : **.*. :.*	
L.pneu	WMDLYFKNN-LAKCPLSHLIMLAPANHGSSALAQLGKSRLGRIKSFFE---GIEP GKCVL	148
L.spir	WMDLYFGNN-LAKCPLSHLIMLAPANHGSSALAQLGKSRLGRIKSFFE---GVEPGEHVL	148
L.dran	WMDLYFKNN-LEKCPLSHLIMLAPANHGSSALAQLGKSRLGRIKSFFE---GVEPGQHVL	173
P.ing	WLNRFYMGSLLSQSPLRHLVMLAPANHGSSALALGKQRVGRKAWFS---GVEPGQRIL	149
D.acet	WLNRFYGPKEKLSATPLCHLVMMLAPANHGSSALALGKQRVGRIDAWFK---GVEPGQVRV	148
S.peal	WLQTFFTGDKLSRCPLTHLIMLAPANHGSSALAQLGKSRLGRIKSFFA---GVEPGQGIL	143
M.algi	WLTNYFKPR---TSPIKRLMLAPANFGSPLAHTGRSLIGRAVKGWKGT-RLFETGTKIL	153
P.aeru	WLTRRFTPA---SAPVKRLMLAPANFGSPLAHKGRSFIGRVLKGWN-R-FVGQTGTQVL	142
P.mari	FIAEYYRHR-IDKCPVKKIIMLAPANFGSPLAHYKSLLMVMFVKGRYKFGDMFEVGRLL	150
	: : * : : : *****.*.* * : . : * : *	
L.pneu	DWLELGSDMSWQLNESWLDYDCTANGVYSFVLTGQKIDRQFYDAVN SYTGESGSDGVVVRV	208
L.spir	DWLELGSDMSWQLNESWLDYDCPANGIYTFVLTGQKIDRQLYDAVNSYTGESGSDGVVVRV	208
L.dran	DWLELGSDMSWQLNESWLDYDCTANGIYSFVLTGQKIDRQLYDAVNSYTGESGSDGVVVRV	233
P.ing	DWLSLGSHQQIALAQSYLTYKPAENKFFPFVLTGQTIDKKLYDFVNNYLVEAGSDGVVVRV	209
D.acet	DWLCLGSRQRLNESGLHYDAAHNIYPFVLTGQGIDRKFYDFINNYLTPGSDGVVVRV	208
S.peal	DWLELGSDGQYDLNRYWLDN-FSLDGPLPFVLTGGEAIDSQFYDYLN SYTAEAGSDGVVVRV	202
M.algi	KGLEIASPYSWSLAEKDI FAEQYQYGPGRILCT-VLVGNIGYNGISALANKPGTDGTVRV	212
P.aeru	KGLELGSPYSWTLAERDLFAAESWYGAGRLLAT-VLVGNVGYNGVEAIANEAGGDGTVRI	201
P.mari	NGLELASPYQWKLAMDDLKERPYYN-RNQIQTFIFVGNKYGGLRKLNVNKGTDGTVVV	209
	. * :.* . * . : : * :. *. : : * **.* :	
L.pneu	AATNMNYSILKLHQEGDNGES-----LVVAKMTRTQPMAGVLPGLSHSGKNIGII	259
L.spir	AAANMNYSLLKLHQEGTNGDS-----LVVAKMKRAQPTAFGVLPGLSHSGKNIGII	259
L.dran	AATNMNYSLLKLHQEGNNGDN-----LVVAKMIRTQPMAGVLPGRSHSGKNIGII	284
P.ing	ACANLNYSMIKLVEEKVAHDSDEKARLLEVEGELQRP-SAPFGVIPGASHSGKDKGIM	268
D.acet	AGANMNYSRFFSVCSQSDVLRKSPYKTRTLAYDKKHPVRTSPAVPLGVYNQYSHSGKDMGIM	268
S.peal	ASANLNFSYLLLAETAHTCDGFDKRCISTLKLSKHSQPHQQTAFEVIKNASHSGSKGIM	262
M.algi	STANLNATKLDLDFTLAQES-----VAITGRRDHGSTAFGIADQEDHS-----	255
P.aeru	STANLNARRLTLELDVRQRAR-----PGWSLERSRGEIAFAILDGENHS-----	245
P.mari	CGTNLNPVKFILDFSREGKAV-----DVYVKDYRFDTAFAVLRNYDHG-----S	253
	. :.* : : . : : .*	
L.pneu	RSITMANAATHPTAIWILRCLQVKS RDSYNKLVKELDNITKETQKNEHKEFVKTLVFTRE	319
L.spir	RSVTMANAATHPTAIWVLRCLQVKNRDAYNTLAKELDKITKETQKNEHTESVKTLIYKRE	319
L.dran	RSVTMANAATHPTTIWVLRCLQVKNRDTYNTLAKELDKMTQETQKNEHTEAVKTLIYKRE	344
P.ing	RSVLSAKSKNKPQVTEILKCLTVNNQADYTNRGKELEILTQESQ-----	312
D.acet	RSIKQDKGAAPVVDADILKCLQIESADGYQQRAEELNALTETMQTE-----ACQQ	318
S.peal	GSVTNRNAKNKPVVQRIACQLRVTS PKQYRQLSDEMSQASSIKR-----	306
M.algi	SIAAKDGGPHRRSIWKLIREALKVEDSDFSKWQDTLTKHNQEVTKQAE-----RRRG	307
P.aeru	TLALKDRGPKNPLSLELIRALEVEDADYKTSAGSFP--WQRRIQDF-----PGIA	295
P.mari	IVDDIKPGRKSQIADLVLRRAIKKPEEYAEFKKELEEITEKTFKN-----	299
	. : : . : : .	

L.pneu	YITNRYSMIIFRLIDDRGNHLI--DYDLYLTAGPQYSEQALPAG-----	361
L.spir	YITNRYSMIIFRLIDDRGNHLV--DYDLYLTAGPEYSEQALPAG-----	361
L.dran	YSTNRYSMIIFRLIDDRGNHLV--DYDLYLTAGPKYSEEALPKG-----	386
P.ing	KGTHRYVMLVFIKDDQGDVPN--DYDLLLLGGDSHNPKNLTKG-----	354
D.acet	RDCDRYAMLVFRKDDQGNFTSKDDYDILLGGKSYQPNIMPKS-----	362
S.peal	--KPRACMLVVRVTDDTGLPVE--DFDILLLSGPHFVPGEFKKG-----	346
M.algi	THHDSYQNTVIRVIDNQGSVQ--DYVIEFFVNDDSGRRNRHRTR-----L	351
P.aeru	ERSPRYLNLVSHVCDDLQGEVH--DYFIQFFRKLNSDRRFEQR-----	336
P.mari	--REIYQQFIVRAVDDHNKPIK--DYTIEFFVYKYNTRYIRNGEFTKKKISAE E E YWSRR	355
	: * : . . * : : :	
L.pneu	----FFVDRQRNLNNRGKLTyFLDYDIMEGGIN--TPKMQGNLGFRVKAYPESSDQALAY	415
L.spir	----FFVDRQRNLNNRGKLTyFLDYDIMEAGIN--TPKMQGNLGFRKAYPQSSGQALAY	415
L.dran	----FFVDRQRNMHNRGKLTyFLDYDIMEAGIN--TPKMQGNLGFRKAYPEASNQALAY	440
P.ing	----FFVDRQQNAAHPNHLIYYVDYDLV-----IKNKLTGFRVIARPAD---GFVF	398
D.acet	----FLRDRQMNGKTSN-LVFYIDVDQFHQ-----IKDSQFGIRVIARPQK---GFSY	407
S.peal	----FMLDKQKNHTNKHVLTFFYFDADKLAK-----VSEGKIGIRVEPRPNS---GMCY	392
M.algi	LQENVVANVHAWCDDASYRSLVNCTELSKILD--KESDDLNISITASP--DIMNRPVGY	407
P.aeru	FYERVIADVHPYEDNPAYRSIHLSVQALDELLAG-FAVDSLSSLVSAQPLFDP RPQVGY	395
P.mari	FHELITDEFHNNSTDPFRFRFIVGIKKLKNEIKECKSLGSDIVLSMKIYVPRVDEGIYY	415
	. : : :	
L.pneu	YRLLDHFHSSLADIH-----KILHPNETVMVEIMLQRRVDRTVFRISNNLTP----	461
L.spir	YRLLDHFHSSLADIN-----KILHPNETVMIEIMLQRRVDRTVSRITNNLTP----	461
L.dran	YRLLDHFHSSLADIN-----KILQPNETVMVEIMLQRRVDRTVFRITNNLSP----	486
P.ing	YHVVEYRANGLNIN-----DLIKPNETFYVEIQLHRCVDKNVFRMDNASDPKLRKE	449
D.acet	YQWAEFRSDGVSLT-----DIVAPNQTTYVDITLKRCDKNVFRFARGD-----	451
S.peal	YLSAEFRSDVEQVH-----ELLIADQTTMVDIVLQRRIKPETFSFIAPK-----	436
M.algi	RTYTDEDISTLCLDQNALR----DLFKPNRTLLITMKIKRYQKDNVVFQFKSIN-----	456
P.aeru	SAVGPGDSEGLGVPRERLG----EFFAAHQTLRLRLRLTRLDGRVFLKDA-----	443
P.mari	ETEKLNIIILLRTENGQIVDEKPSLFYPNTTTTLEMKINRSTKYVTVDIKPRKH-----	469
 * : : : * . . :	
L.pneu	-----AKISGKPTGKKID--	474
L.spir	-----AKISVKPTGKTVD--	474
L.dran	-----EKISAKPTGKKVD--	499
P.ing	GFLIKSETRHSFENLEPSKEEINKS	474
D.acet	-----EKRGSFKGVKADGGEIKDL	470
S.peal	-----DGGDFSYLIDE-----	447
M.algi	-----	
P.aeru	-----	
P.mari	-----	

Der Sequenzvergleich von *L. pneumophila* und den acht uncharakterisierten bekannten Homologen (Bender et al., 2009) wurde mit dem Programm ClustalW2 erstellt. Die katalytische Triade mit seinen neuen Sequenzmotiven ist grau unterlegt. Die 24 Aminosäuren der Zufallsmutagenese sind rot markiert. Abk.: *Legionella pneumophila* (L.pneu), *Legionella spiritensis* (L.spir), *Legionella drancourtii* (L.dran), *Psychromonas ingrahamii* (P.ing), *Desulfurimonas acetoxidans* (D.acet), *Shewanella pealeana* (S.peal), *Marinobacter algicola* (M.algi), *Pseudomonas aeruginosa* PA7 (P.aeru), *Persephonella marina* (P.mari).

Literaturverzeichnis

- Akoh, C.C., G.-C. Lee, Y.-C. Liaw, T.-H. Huang & J.-F. Shaw, (2004) GDSL family of serine esterases/lipases. *Progress in lipid research* **43**: 534-552.
- Albert-Weissenberger, C., C. Cazalet & C. Buchrieser, (2007) Legionella pneumophila - a human pathogen that co-evolved with fresh water protozoa. *Cellular and molecular life sciences* **64**: 432-448.
- Aloulou, A., Y.B. Ali, S. Bezzine, Y. Gargouri & M.H. Gelb, (2012) Phospholipases: an overview. In: Lipases and Phospholipases. Springer, pp. 63-85.
- Amemura-Maekawa, J. & H. Watanabe, (1997) Cloning and sequencing of the dnaK and grpE genes of Legionella pneumophila. *Gene* **197**: 165-168.
- Anderson, C., P. Pinsirodom & K.L. Parkin, (2002) Hydrolytic selectivity of patatin (lipid acyl hydrolase) from potato (Solanum tuberosum L.) tubers toward various lipids. *Journal of food biochemistry* **26**: 63-74.
- Andrews, D., B. Beames, M. Summers & W. Park, (1988) Characterization of the lipid acyl hydrolase activity of the major potato (Solanum tuberosum) tuber protein, patatin, by cloning and abundant expression in a baculovirus vector. *Biochem. J* **252**: 199-206.
- Aragon, V., S. Kurtz & N.P. Cianciotto, (2001) Legionella pneumophila major acid phosphatase and its role in intracellular infection. *Infection and immunity* **69**: 177-185.
- Aragon, V., O. Rossier & N.P. Cianciotto, (2002) Legionella pneumophila genes that encode lipase and phospholipase C activities. *Microbiology* **148**: 2223-2231.
- Armah, D.A. & K. Mensa-Wilmot, (2000) Tetramerization of glycosylphosphatidylinositol-specific phospholipase C from Trypanosoma brucei. *Journal of Biological Chemistry* **275**: 19334-19342.
- Arpigny, J. & K. Jaeger, (1999) Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochem. J* **343**: 177-183.
- Aurass, P., B. Pless, K. Rydzewski, G. Holland, N. Bannert & A. Flieger, (2009) bdhA-patD operon as a virulence determinant, revealed by a novel large-scale approach for identification of Legionella pneumophila mutants defective for amoeba infection. *Applied and environmental microbiology* **75**: 4506-4515.
- Aurass, P., M. Schlegel, O. Metwally, C.R. Harding, G.N. Schroeder, G. Frankel & A. Flieger, (2013) The Legionella pneumophila Dot/Icm-secreted effector PlcC/CegC1 together with PlcA and PlcB promotes virulence and belongs to a novel zinc metallophospholipase C family present in bacteria and fungi. *Journal of Biological Chemistry* **288**: 11080-11092.
- Bachman, M.A. & M.S. Swanson, (2004) The LetE protein enhances expression of multiple LetA/LetS-dependent transmission traits by Legionella pneumophila. *Infection and immunity* **72**: 3284-3293.
- Bandyopadhyay, P., S. Liu, C.B. Gabbai, Z. Venitelli & H.M. Steinman, (2007) Environmental mimics and the Lvh type IVA secretion system contribute to virulence-related phenotypes of Legionella pneumophila. *Infection and immunity* **75**: 723-735.

- Banerji, S., P. Aurass & A. Flieger, (2008) The manifold phospholipases A of *Legionella pneumophila*–Identification, export, regulation, and their link to bacterial virulence. *International Journal of Medical Microbiology* **298**: 169-181.
- Banerji, S., M. Bewersdorff, B. Hermes, N.P. Cianciotto & A. Flieger, (2005) Characterization of the major secreted zinc metalloprotease-dependent glycerophospholipid: cholesterol acyltransferase, PlaC, of *Legionella pneumophila*. *Infection and immunity* **73**: 2899-2909.
- Banerji, S. & A. Flieger, (2004) Patatin-like proteins: a new family of lipolytic enzymes present in bacteria? *Microbiology* **150**: 522-525.
- Barker, J., M. Brown, P.J. Collier, I. Farrell & P. Gilbert, (1992) Relationship between *Legionella pneumophila* and *Acanthamoeba polyphaga*: physiological status and susceptibility to chemical inactivation. *Applied and environmental microbiology* **58**: 2420-2425.
- Barker, J., H. Scaife & M. Brown, (1995) Intraphagocytic growth induces an antibiotic-resistant phenotype of *Legionella pneumophila*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **39**: 2684-2688.
- Beernink, P.T. & D.R. Tolan, (1996) Disruption of the aldolase A tetramer into catalytically active monomers. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **93**: 5374-5379.
- Bellinger-Kawahara, C. & M.A. Horwitz, (1990) Complement component C3 fixes selectively to the major outer membrane protein (MOMP) of *Legionella pneumophila* and mediates phagocytosis of liposome-MOMP complexes by human monocytes. *The Journal of experimental medicine* **172**: 1201-1210.
- Bender, J., (2009*) Biochemische und funktionelle Charakterisierung der zell-assoziierten Phospholipase A, PlaB, von *Legionella pneumophila*. Dissertation
- Bender, J., K. Rydzewski, M. Broich, E. Schunder, K. Heuner & A. Flieger, (2009) Phospholipase PlaB of *Legionella pneumophila* Represents a Novel Lipase Family: protein residues essential for lipolytic activity, substrate specificity, and hemolysis. *Journal of biological chemistry* **284**: 27185-27194.
- Bendtsen, J.D., L. Kierner, A. Fausbøll & S. Brunak, (2005) Non-classical protein secretion in bacteria. *BMC microbiology* **5**: 58.
- Benson, R.F. & B.S. Fields, (1998) Classification of the genus *Legionella*. In: Seminars in respiratory infections. pp. 90-99.
- Bligh, E.G. & W.J. Dyer, (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology* **37**: 911-917.
- Bradford, M.M., (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* **72**: 248-254.
- Brassinga, A.K.C., M.F. Hiltz, G.R. Sisson, M.G. Morash, N. Hill, E. Garduno, P.H. Edelstein, R.A. Garduno & P.S. Hoffman, (2003) A 65-kilobase pathogenicity island is unique to Philadelphia-1 strains of *Legionella pneumophila*. *Journal of bacteriology* **185**: 4630-4637.
- Brick, D.J., M.J. Brumlik, J.T. Buckley, J.-X. Cao, P.C. Davies, S. Misra, T.J. Tranbarger & C. Upton, (1995) A new family of lipolytic plant enzymes with members in rice, arabidopsis and maize. *FEBS letters* **377**: 475-480.

- Brodhun, B. & U. Buchholz, (2011) [Epidemiology of Legionnaires' disease in Germany]. *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz* **54**: 680-687.
- Brüggemann, H., A. Hagman, M. Jules, O. Sismeiro, M.A. Dillies, C. Gouyette, F. Kunst, M. Steinert, K. Heuner & J.Y. Coppée, (2006) Virulence strategies for infecting phagocytes deduced from the in vivo transcriptional program of *Legionella pneumophila*. *Cellular microbiology* **8**: 1228-1240.
- Buckley, J.T., L.N. Halasa & S. MacIntyre, (1982) Purification and partial characterization of a bacterial phospholipid: cholesterol acyltransferase. *Journal of Biological Chemistry* **257**: 3320-3325.
- Burstein, D., T. Zusman, E. Degtyar, R. Viner, G. Segal & T. Pupko, (2009) Genome-scale identification of *Legionella pneumophila* effectors using a machine learning approach. *PLoS pathogens* **5**: e1000508.
- Byrne, B. & M.S. Swanson, (1998) Expression of *Legionella pneumophila* virulence traits in response to growth conditions. *Infection and immunity* **66**: 3029-3034.
- Campocasso, A., M. Boughalmi, G. Fournous, D. Raoult & B. La Scola, (2012) *Legionella tunisiensis* sp. nov. and *Legionella massiliensis* sp. nov., isolated from environmental water samples. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **62**: 3003-3006.
- Carrière, F., C. Withers-Martinez, H. van Tilbeurgh, A. Roussel, C. Cambillau & R. Verger, (1998) Structural basis for the substrate selectivity of pancreatic lipases and some related proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes* **1376**: 417-432.
- Cazalet, C., L. Gomez-Valero, C. Rusniok, M. Lomma, D. Dervins-Ravault, H.J. Newton, F.M. Sansom, S. Jarraud, N. Zidane & L. Ma, (2010) Analysis of the *Legionella longbeachae* genome and transcriptome uncovers unique strategies to cause Legionnaires' disease. *PLoS genetics* **6**: e1000851.
- Cazalet, C., C. Rusniok, H. Brüggemann, N. Zidane, A. Magnier, L. Ma, M. Tichit, S. Jarraud, C. Bouchier & F. Vandenesch, (2004) Evidence in the *Legionella pneumophila* genome for exploitation of host cell functions and high genome plasticity. *Nature genetics* **36**: 1165-1173.
- Chebotareva, N., B. Kurganov & N. Livanova, (2004) Biochemical effects of molecular crowding. *Biochemistry (Moscow)* **69**: 1239-1251.
- Cheng, J., R. Goldstein, B. Stec, A. Gershenson & M.F. Roberts, (2012) Competition between Anion Binding and Dimerization Modulates *Staphylococcus aureus* Phosphatidylinositol-specific Phospholipase C Enzymatic Activity. *Journal of Biological Chemistry* **287**: 40317-40327.
- Chien, M., I. Morozova, S. Shi, H. Sheng, J. Chen, S.M. Gomez, G. Asamani, K. Hill, J. Nuara & M. Feder, (2004) The genomic sequence of the accidental pathogen *Legionella pneumophila*. *Science* **305**: 1966-1968.
- Chioato, L., E.A. Aragão, T. Lopes Ferreira, A. Ivo de Medeiros, L.H. Faccioli & R.J. Ward, (2007) Mapping of the structural determinants of artificial and biological membrane damaging activities of a Lys49 phospholipase A2 by scanning alanine mutagenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **1768**: 1247-1257.
- Chou, K.C. & D.W. Elrod, (1999) Prediction of membrane protein types and subcellular locations. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **34**: 137-153.

- Chusacultanachai, S. & Y. Yuthavong, (2004) Random mutagenesis strategies for construction of large and diverse clone libraries of mutated DNA fragments. In: *Parasite Genomics Protocols*. Springer, pp. 319-333.
- Cianciotto, N., B. Eisenstein, N.C. Engleberg & H. Shuman, (1989) Genetics and molecular pathogenesis of *Legionella pneumophila*, an intracellular parasite of macrophages. *Molecular biology & medicine* **6**: 409.
- Cianciotto, N.P., (2001) Pathogenicity of *Legionella pneumophila*. *International Journal of Medical Microbiology* **291**: 331-343.
- Cianciotto, N.P., (2005) Type II secretion: a protein secretion system for all seasons. *Trends in microbiology* **13**: 581-588.
- Cianciotto, N.P., (2009) Many substrates and functions of type II secretion: lessons learned from *Legionella pneumophila*. *Future microbiology* **4**: 797-805.
- Cianciotto, N.P., (2014) Type II Secretion and *Legionella* Virulence. *Molecular Mechanisms in Legionella Pathogenesis*: 81-102.
- Cianciotto, N.P., J.M. Bangsberg, B.I. Eisenstein & N.C. Engleberg, (1990*) Identification of mip-like genes in the genus *Legionella*. *Infection and immunity* **58**: 2912-2918.
- Cianciotto, N.P., B.I. Eisenstein, C.H. Mody & N.C. Engleberg, (1990) A mutation in the mip gene results in an attenuation of *Legionella pneumophila* virulence. *Journal of Infectious Diseases* **162**: 121-126.
- Cianciotto, N.P. & B.S. Fields, (1992) *Legionella pneumophila* mip gene potentiates intracellular infection of protozoa and human macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **89**: 5188-5191.
- Cianciotto, N.P., J.K. Stamos & D.W. Kamp, (1995) Infectivity of *Legionella pneumophila* mip mutant for alveolar epithelial cells. *Current microbiology* **30**: 247-250.
- Cirillo, J.D., S.L. Cirillo, L. Yan, L.E. Bermudez, S. Falkow & L.S. Tompkins, (1999) Intracellular growth in *Acanthamoeba castellanii* affects monocyte entry mechanisms and enhances virulence of *Legionella pneumophila*. *Infection and immunity* **67**: 4427-4434.
- Cirino, P.C., K.M. Mayer & D. Umeno, (2003) Generating mutant libraries using error-prone PCR. In: *Directed Evolution Library Creation*. Springer, pp. 3-9.
- Conlan, J., A. Williams & L. Ashworth, (1988) Inactivation of human α -1-antitrypsin by a tissue-destructive protease of *Legionella pneumophila*. *Journal of general microbiology* **134**: 481-487.
- Cornelis, G.R., (2006) The type III secretion injectisome. *Nature Reviews Microbiology* **4**: 811-825.
- Cottrell, J.S. & U. London, (1999) Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* **20**: 3551-3567.
- Creasey, E.A. & R.R. Isberg, (2012) The protein SdhA maintains the integrity of the *Legionella*-containing vacuole. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**: 3481-3486.

- Cuzick, A., F.R. Stirling, S.L. Lindsay & T.J. Evans, (2006) The type III pseudomonal exotoxin U activates the c-Jun NH2-terminal kinase pathway and increases human epithelial interleukin-8 production. *Infection and immunity* **74**: 4104-4113.
- Davis, R., H. Wong, J. Nikazy, K. Wang, Q. Han & M. Schotz, (1992) Chimeras of hepatic lipase and lipoprotein lipase. Domain localization of enzyme-specific properties. *Journal of Biological Chemistry* **267**: 21499-21504.
- De Buck, E., D. Höper, E. Lammertyn, M. Hecker & J. Anné, (2008) Differential 2-D protein gel electrophoresis analysis of *Legionella pneumophila* wild type and Tat secretion mutants. *International Journal of Medical Microbiology* **298**: 449-461.
- De Buck, E., I. Lebeau, L. Maes, N. Geukens, E. Meyen, L. Van Mellaert, J. Anné & E. Lammertyn, (2004) A putative twin-arginine translocation pathway in *Legionella pneumophila*. *Biochemical and biophysical research communications* **317**: 654-661.
- De Buck, E., L. Maes, E. Meyen, L. Van Mellaert, N. Geukens, J. Anné & E. Lammertyn, (2005) *Legionella pneumophila* Philadelphia-1 tatB and tatC affect intracellular replication and biofilm formation. *Biochemical and biophysical research communications* **331**: 1413-1420.
- De Buck, E., L. Vranckx, E. Meyen, L. Maes, L. Vandersmissen, J. Anné & E. Lammertyn, (2007) The twin-arginine translocation pathway is necessary for correct membrane insertion of the Rieske Fe/S protein in *Legionella pneumophila*. *FEBS letters* **581**: 259-264.
- De Oliveira, A., J. Giglio, S. Andriao-Escarso, A. Ito & R. Ward, (2001) A pH-induced dissociation of the dimeric form of a lysine 49-phospholipase A2 abolishes Ca²⁺-independent membrane damaging activity. *Biochemistry* **40**: 6912-6920.
- DebRoy, S., V. Aragon, S. Kurtz & N.P. Cianciotto, (2006*) *Legionella pneumophila* Mip, a surface-exposed peptidylproline cis-trans-isomerase, promotes the presence of phospholipase C-like activity in culture supernatants. *Infection and immunity* **74**: 5152-5160.
- DebRoy, S., J. Dao, M. Söderberg, O. Rossier & N.P. Cianciotto, (2006) *Legionella pneumophila* type II secretome reveals unique exoproteins and a chitinase that promotes bacterial persistence in the lung. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**: 19146-19151.
- Dekker, N., (2000) Outer-membrane phospholipase A: known structure, unknown biological function. *Molecular microbiology* **35**: 711-717.
- Dekker, N., J. Tommassen, A. Lustig, J.P. Rosenbusch & H.M. Verheij, (1997) Dimerization regulates the enzymatic activity of *Escherichia coli* outer membrane phospholipase A. *Journal of Biological Chemistry* **272**: 3179-3184.
- Dennis, E.A., S.G. Rhee, M.M. Billah & Y. Hannun, (1991) Role of phospholipase in generating lipid second messengers in signal transduction. *The FASEB journal* **5**: 2068-2077.
- Diederer, B., (2008) *Legionella* spp. and Legionnaires' disease. *Journal of Infection* **56**: 1-12.
- Donlan, R., T. Forster, R. Murga, E. Brown, C. Lucas, J. Carpenter & B. Fields, (2005) *Legionella pneumophila* associated with the protozoan *Hartmannella vermiformis* in a model multi-species biofilm has reduced susceptibility to disinfectants. *Biofouling* **21**: 1-7.
- Dowling, J.N., A. Saha & R. Glew, (1992) Virulence factors of the family Legionellaceae. *Microbiological reviews* **56**: 32.

- Dugi, K., H. Dichek, G. Talley, H. Brewer & S. Santamarina-Fojo, (1992) Human lipoprotein lipase: the loop covering the catalytic site is essential for interaction with lipid substrates. *Journal of Biological Chemistry* **267**: 25086-25091.
- Dugi, K.A., H.L. Dichek & S. Santamarina-Fojo, (1995) Human hepatic and lipoprotein lipase: the loop covering the catalytic site mediates lipase substrate specificity. *Journal of Biological Chemistry* **270**: 25396-25401.
- Edelstein, P.H., (2008) Legionnaires' disease: history and clinical findings. *Legionella: Molecular Microbiology*: 1-18.
- Edelstein, P.H., M.A. Edelstein, F. Higa & S. Falkow, (1999) Discovery of virulence genes of *Legionella pneumophila* by using signature tagged mutagenesis in a guinea pig pneumonia model. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**: 8190-8195.
- Edman, P. & G. Begg, (1967) A protein sequenator. *European Journal of Biochemistry* **1**: 80-91.
- Ellis, R.J., (2001) Macromolecular crowding: an important but neglected aspect of the intracellular environment. *Current opinion in structural biology* **11**: 114-119.
- Ensminger, A.W. & R.R. Isberg, (2009) *Legionella pneumophila* Dot/Icm translocated substrates: a sum of parts. *Current opinion in microbiology* **12**: 67-73.
- Eylert, E., V. Herrmann, M. Jules, N. Gillmaier, M. Lautner, C. Buchrieser, W. Eisenreich & K. Heuner, (2010) Isotopologue Profiling of *Legionella pneumophila*: role of serine and glucose as carbon substrates. *Journal of biological chemistry* **285**: 22232-22243.
- Fang, G.-D., V.L. Yu & R.M. Vickers, (1989) Disease due to the Legionellaceae (other than *Legionella pneumophila*): historical, microbiological, clinical, and epidemiological review. *Medicine* **68**: 116.
- Faulkner, G. & R.A. Garduño, (2013) Electron microscopy of *Legionella* and *Legionella*-infected cells. In: *Legionella*. Springer, pp. 279-307.
- Fields, B.S., (1996) The molecular ecology of legionellae. *Trends in microbiology* **4**: 286-290.
- Fields, B.S., R.F. Benson & R.E. Besser, (2002) *Legionella* and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. *Clinical microbiology reviews* **15**: 506-526.
- Filloux, A., (2004) The underlying mechanisms of type II protein secretion. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* **1694**: 163-179.
- Finck-Barbançon, V. & D.W. Frank, (2001) Multiple domains are required for the toxic activity of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU. *Journal of bacteriology* **183**: 4330-4344.
- Finck-Barbançon, V., J. Goranson, L. Zhu, T. Sawa, J.P. Wiener-Kronish, S.M. Fleiszig, C. Wu, L. Mende-Mueller & D.W. Frank, (1997) ExoU expression by *Pseudomonas aeruginosa* correlates with acute cytotoxicity and epithelial injury. *Molecular microbiology* **25**: 547-557.
- Finnerty, W., R. Makula & J.C. Feeley, (1979) Cellular lipids of the Legionnaires' disease bacterium. *Annals of internal medicine* **90**: 631-634.
- Fischer, G., H. Bang, B. Ludwig, K. Mann & J. Hacker, (1992) Mip protein of *Legionella pneumophila* exhibits peptidyl-prolyl-cis/trans isomerase (PPIase) activity. *Molecular microbiology* **6**: 1375-1383.

- Flieger, A., S. Gong, M. Faigle, H.A. Mayer, U. Kehrner, J. Mußotter, P. Bartmann & B. Neumeister, (2000) Phospholipase A secreted by *Legionella pneumophila* destroys alveolar surfactant phospholipids. *FEMS microbiology letters* **188**: 129-133.
- Flieger, A., S. Gong, M. Faigle, S. Stevanovic, N.P. Cianciotto & B. Neumeister, (2001) Novel lysophospholipase A secreted by *Legionella pneumophila*. *Journal of bacteriology* **183**: 2121-2124.
- Flieger, A., B. Neumeister & N.P. Cianciotto, (2002) Characterization of the gene encoding the major secreted lysophospholipase A of *Legionella pneumophila* and its role in detoxification of lysophosphatidylcholine. *Infection and immunity* **70**: 6094-6106.
- Flieger, A., K. Rydzewski, S. Banerji, M. Broich & K. Heuner, (2004) Cloning and characterization of the gene encoding the major cell-associated phospholipase A of *Legionella pneumophila*, *plaB*, exhibiting hemolytic activity. *Infection and immunity* **72**: 2648-2658.
- Franke, D. & D.I. Svergun, (2009) DAMMIF, a program for rapid ab-initio shape determination in small-angle scattering. *Journal of Applied Crystallography* **42**: 342-346.
- Fraser, D.W., T.R. Tsai, W. Orenstein, W.E. Parkin, H.J. Beecham, R.G. Sharrar, J. Harris, G.F. Mallison, S.M. Martin & J.E. McDade, (1977) Legionnaires' disease: description of an epidemic of pneumonia. *New England Journal of Medicine* **297**: 1189-1197.
- Gabay, J., M. Blake, W. Niles & M. Horwitz, (1985) Purification of *Legionella pneumophila* major outer membrane protein and demonstration that it is a porin. *Journal of bacteriology* **162**: 85-91.
- Galka, F., S.N. Wai, H. Kusch, S. Engelmann, M. Hecker, B. Schmeck, S. Hippenstiel, B.E. Uhlin & M. Steinert, (2008) Proteomic characterization of the whole secretome of *Legionella pneumophila* and functional analysis of outer membrane vesicles. *Infection and immunity* **76**: 1825-1836.
- Gao, L.-Y., O.S. Harb & Y.A. Kwaik, (1997) Utilization of similar mechanisms by *Legionella pneumophila* to parasitize two evolutionarily distant host cells, mammalian macrophages and protozoa. *Infection and immunity* **65**: 4738-4746.
- Garduno, R.A., E. Garduno, M. Hiltz & P.S. Hoffman, (2002) Intracellular growth of *Legionella pneumophila* gives rise to a differentiated form dissimilar to stationary-phase forms. *Infection and immunity* **70**: 6273-6283.
- Garian, R., (2001) Prediction of quaternary structure from primary structure. *Bioinformatics* **17**: 551-556.
- Garrity, G.M., J.A. Bell & T.G. Lilburn, (2004) Taxonomic outline of the prokaryotes. Bergey's manual of systematic bacteriology. *Springer, New York, Berlin, Heidelberg*.
- Gaspar, A.H. & M.P. Machner, (2014) VipD is a Rab5-activated phospholipase A1 that protects *Legionella pneumophila* from endosomal fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*: 201316376.
- Gauster, M., A. Hrzenjak, K. Schick & S. Frank, (2005) Endothelial lipase is inactivated upon cleavage by the members of the proprotein convertase family. *Journal of lipid research* **46**: 977-987.

- Gendrin, C., C. Contreras-Martel, S. Bouillot, S. Elsen, D. Lemaire, D.A. Skoufias, P. Huber, I. Attree & A. Dessen, (2012) Structural basis of cytotoxicity mediated by the type III secretion toxin ExoU from *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS pathogens* **8**: e1002637.
- George, J., L. Pine, M. Reeves & W.K. Harrell, (1980) Amino acid requirements of *Legionella pneumophila*. *Journal of clinical microbiology* **11**: 286-291.
- Geukens, N., E. De Buck, E. Meyen, L. Maes, L. Vranckx, L. Van Mellaert, J. Anné & E. Lammertyn, (2006) The type II signal peptidase of *Legionella pneumophila*. *Research in microbiology* **157**: 836-841.
- Glick, T.H., M.B. Gregg, B. Berman, G. Mallison, W.W. Rhodes & I. Kassanoff, (1978) Pontiac fever. An epidemic of unknown etiology in a health department: I. clinical and epidemiologic aspects. *American Journal of Epidemiology* **107**: 149-160.
- Glöckner, G., C. Albert-Weissenberger, E. Weinmann, S. Jacobi, E. Schunder, M. Steinert, J. Hacker & K. Heuner, (2008) Identification and characterization of a new conjugation/type IVA secretion system (trb/tra) of *Legionella pneumophila* Corby localized on two mobile genomic islands. *International Journal of Medical Microbiology* **298**: 411-428.
- Gomez-Valero, L., C. Rusniok, C. Cazalet & C. Buchrieser, (2011) Comparative and functional genomics of *Legionella* identified eukaryotic like proteins as key players in host-pathogen interactions. *Legionella: from protozoa to humans*: 8.
- Gosting, L.H., K. Cabrian, J.C. Sturge & L.C. Goldstein, (1984) Identification of a species-specific antigen in *Legionella pneumophila* by a monoclonal antibody. *Journal of clinical microbiology* **20**: 1031-1035.
- Grant, K.A., I.U. Belandia, N. Dekker, P.T. Richardson & S.F. Park, (1997) Molecular characterization of *pldA*, the structural gene for a phospholipase A from *Campylobacter coli*, and its contribution to cell-associated hemolysis. *Infection and immunity* **65**: 1172-1180.
- Griffon, N., E.C. Budreck, C.J. Long, U.C. Broedl, D.H. Marchadier, J.M. Glick & D.J. Rader, (2006) Substrate specificity of lipoprotein lipase and endothelial lipase: studies of lid chimeras. *Journal of lipid research* **47**: 1803-1811.
- Griffon, N., W. Jin, T.J. Petty, J. Millar, K.O. Badellino, J.G. Saven, D.H. Marchadier, E.S. Kempner, J. Billheimer & J.M. Glick, (2009) Identification of the active form of endothelial lipase, a homodimer in a head-to-tail conformation. *Journal of Biological Chemistry* **284**: 23322-23330.
- Hales, L.M. & H.A. Shuman, (1999) *Legionella pneumophila* contains a type II general secretion pathway required for growth in amoebae as well as for secretion of the Msp protease. *Infection and immunity* **67**: 3662-3666.
- Hales, L.M. & H.A. Shuman, (1999*) The *Legionella pneumophila* *rpoS* gene is required for growth within *Acanthamoeba castellanii*. *Journal of bacteriology* **181**: 4879-4889.
- Hammer, B.K. & M.S. Swanson, (1999) Co-ordination of *Legionella pneumophila* virulence with entry into stationary phase by ppGpp. *Molecular microbiology* **33**: 721-731.
- Hammer, B.K., E.S. Tateda & M.S. Swanson, (2002) A two-component regulator induces the transmission phenotype of stationary-phase *Legionella pneumophila*. *Molecular microbiology* **44**: 107-118.

- Harb, O.S., C. Venkataraman, B.J. Haack, L.-Y. Gao & Y.A. Kwaik, (1998) Heterogeneity in the attachment and uptake mechanisms of the Legionnaires' disease bacterium, *Legionella pneumophila*, by protozoan hosts. *Applied and environmental microbiology* **64**: 126-132.
- Harrison, T., N. Doshi, N. Fry & C. Joseph, (2007) Comparison of clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila* obtained in the UK over 19 years. *Clinical microbiology and infection* **13**: 78-85.
- Hauser, A.R., (2009) The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. *Nature Reviews Microbiology* **7**: 654-665.
- Hébert, G.A., A.G. Steigerwalt & D.J. Brenner, (1980) *Legionella micdadei* species nova: Classification of a third species of *Legionella* associated with human pneumonia. *Current Microbiology* **3**: 255-257.
- Heidtman, M., E.J. Chen, M.Y. Moy & R.R. Isberg, (2009) Large-scale identification of *Legionella pneumophila* Dot/Icm substrates that modulate host cell vesicle trafficking pathways. *Cellular microbiology* **11**: 230-248.
- Helbig, J., R. Benson, C. Pelaz, E. Jacobs & P. Lück, (2007) Identification and serotyping of atypical *Legionella pneumophila* strains isolated from human and environmental sources. *Journal of applied microbiology* **102**: 100-105.
- Helbig, J., P. Lück, M. Steinert, E. Jacobs & M. Witt, (2001) Immunolocalization of the Mip protein of intracellularly and extracellularly grown *Legionella pneumophila*. *Letters in applied microbiology* **32**: 83-88.
- Helbig, J.H., B. König, H. Knospe, B. Bubert, C. Yu, C.P. Lück, A. Riboldi-Tunncliffe, R. Hilgenfeld, E. Jacobs & J. Hacker, (2003) The PPIase active site of *Legionella pneumophila* Mip protein is involved in the infection of eukaryotic host cells. *Biological chemistry* **384**: 125-137.
- Hell, W., A. Essig, S. Bohnet, S. Gattermann & R. Marre, (1993) Cleavage of tumor necrosis factor- α by *Legionella* exoprotease. *Apmis* **101**: 120-126.
- Hempel, K., J. Pané-Farré, A. Otto, S. Sievers, M. Hecker & D.r. Becher, (2010) Quantitative cell surface proteome profiling for SigB-dependent protein expression in the human pathogen *Staphylococcus aureus* via biotinylation approach. *Journal of proteome research* **9**: 1579-1590.
- Hernandez, F., B. Kirby, T. Stanley & P. Edelstein, (1980) Legionnaires' disease. Postmortem pathologic findings of 20 cases. *American journal of clinical pathology* **73**: 488-495.
- Herrmann, V., A. Eidner, K. Rydzewski, I. Blädel, M. Jules, C. Buchrieser, W. Eisenreich & K. Heuner, (2011) GamA is a eukaryotic-like glucoamylase responsible for glycogen-and starch-degrading activity of *Legionella pneumophila*. *International Journal of Medical Microbiology* **301**: 133-139.
- Heuner, K. & M. Steinert, (2003) The flagellum of *Legionella pneumophila* and its link to the expression of the virulent phenotype. *International Journal of Medical Microbiology* **293**: 133-143.
- Hicklin, M., B. Thomason, F. Chandler & J. Blackmon, (1980) Pathogenesis of acute Legionnaires' disease pneumonia. *American journal of clinical pathology* **73**: 480-487.

- Higgins, J., B. Hitchin & M. Low, (1989) Phosphatidylinositol-specific phospholipase C of *Bacillus thuringiensis* as a probe for the distribution of phosphatidylinositol in hepatocyte membranes. *Biochem. J* **259**: 913-916.
- High, A.S., S.D. Torosian & F.G. Rodgers, (1993) Cloning, nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli* of a gene (ompM) encoding a 25 kDa major outer-membrane protein (MOMP) of *Legionella pneumophila*. *Journal of general microbiology* **139**: 1715-1721.
- Hindahl, M.S. & B.H. Iglewski, (1984) Isolation and characterization of the *Legionella pneumophila* outer membrane. *Journal of bacteriology* **159**: 107-113.
- Hirschberg, H.J., J.W. Simons, N. Dekker & M.R. Egmond, (2001) Cloning, expression, purification and characterization of patatin, a novel phospholipase A. *European Journal of Biochemistry* **268**: 5037-5044.
- Hoffman, P.S., M. Ripley & R. Weeratna, (1992) Cloning and nucleotide sequence of a gene (ompS) encoding the major outer membrane protein of *Legionella pneumophila*. *Journal of bacteriology* **174**: 914-920.
- Horwitz, M.A., (1983) The Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) inhibits phagosome-lysosome fusion in human monocytes. *The Journal of experimental medicine* **158**: 2108-2126.
- Horwitz, M.A. & F.R. Maxfield, (1984) *Legionella pneumophila* inhibits acidification of its phagosome in human monocytes. *The Journal of cell biology* **99**: 1936-1943.
- Horwitz, M.A. & S.C. Silverstein, (1980) Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) multiplies intracellularly in human monocytes. *Journal of Clinical Investigation* **66**: 441.
- Huang, F., P.V. Subbaiah, O. Holian, J. Zhang, A. Johnson, N. Gertzberg & H. Lum, (2005) Lysophosphatidylcholine increases endothelial permeability: role of PKC α and RhoA cross talk. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* **289**: L176-L185.
- Huang, L., D. Boyd, W.M. Amyot, A.D. Hempstead, Z.Q. Luo, T.J. O'Connor, C. Chen, M. Machner, T. Montminy & R.R. Isberg, (2011) The E Block motif is associated with *Legionella pneumophila* translocated substrates. *Cellular microbiology* **13**: 227-245.
- Hubber, A. & C.R. Roy, (2010) Modulation of host cell function by *Legionella pneumophila* type IV effectors. *Annual review of cell and developmental biology* **26**: 261-283.
- Husmann, L.K. & W. Johnson, (1994) Cytotoxicity of extracellular *Legionella pneumophila*. *Infection and immunity* **62**: 2111-2114.
- Ibarguren, M., P.H. Bomans, P.M. Frederik, M. Stonehouse, A.I. Vasil, M.L. Vasil, A. Alonso & F.M. Goñi, (2010) End-products diacylglycerol and ceramide modulate membrane fusion induced by a phospholipase C/sphingomyelinase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **1798**: 59-64.
- Isberg, R.R., T.J. O'Connor & M. Heidtman, (2009) The *Legionella pneumophila* replication vacuole: making a cosy niche inside host cells. *Nature Reviews Microbiology* **7**: 13-24.
- Istivan, T.S. & P.J. Coloe, (2006) Phospholipase A in Gram-negative bacteria and its role in pathogenesis. *Microbiology* **152**: 1263-1274.

- Istivan, T.S., S.C. Smith, B.N. Fry & P.J. Coloe, (2008) Characterization of *Campylobacter concisus* hemolysins. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* **54**: 224-235.
- Jacobi, S. & K. Heuner, (2003) Description of a putative type I secretion system in *Legionella pneumophila*. *International journal of medical microbiology* **293**: 349-358.
- Jaeger, K.-E., S. Ransac, H.B. Koch, F. Ferrato & B.W. Dijkstra, (1993) Topological characterization and modeling of the 3D structure of lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS letters* **332**: 143-149.
- Jepras, R., R. Fitzgeorge & A. Baskerville, (1985) A comparison of virulence of two strains of *Legionella pneumophila* based on experimental aerosol infection of guinea-pigs. *Journal of hygiene* **95**: 29-38.
- Johnson, T.L., J. Abendroth, W.G. Hol & M. Sandkvist, (2006) Type II secretion: from structure to function. *FEMS microbiology letters* **255**: 175-186.
- Kapust, R.B. & D.S. Waugh, (1999) *Escherichia coli* maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. *Protein Science* **8**: 1668-1674.
- Kato, S., T. Yoshimura, H. Hemmi & R. Moriyama, (2009) Biochemical analysis of a novel lipolytic enzyme YvdO from *Bacillus subtilis* 168. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **74**: 701-706.
- Kaufmann, A.F., J.E. McDade, C.M. Patton, J.V. Bennett, P. Skaliy, J.C. Feeley, D.C. Anderson, M.E. Potter, V.F. Newhouse & M.B. Gregg, (1981) Pontiac fever: isolation of the etiologic agent (*Legionella pneumophila*) and demonstration of its mode of transmission. *American journal of epidemiology* **114**: 337-347.
- Keiper, T., J.G. Schneider & K.A. Dugi, (2001) Novel site in lipoprotein lipase (LPL415–438) essential for substrate interaction and dimer stability. *Journal of lipid research* **42**: 1180-1186.
- Kienesberger, P.C., M. Oberer, A. Lass & R. Zechner, (2009) Mammalian patatin domain containing proteins: a family with diverse lipolytic activities involved in multiple biological functions. *Journal of lipid research* **50**: S63-S68.
- Kiernan, J.A., (2000) Formaldehyde, formalin, paraformaldehyde and glutaraldehyde: what they are and what they do. *Microscopy Today* **1**: 8-12.
- Kinnunen, P.K., A. Kõiv, J.Y. Lehtonen, M. Rytömaa & P. Mustonen, (1994) Lipid dynamics and peripheral interactions of proteins with membrane surfaces. *Chemistry and physics of lipids* **73**: 181-207.
- Kirby, J.E., J.P. Vogel, H.L. Andrews & R.R. Isberg, (1998) Evidence for pore-forming ability by *Legionella pneumophila*. *Molecular microbiology* **27**: 323-336.
- Klockenbusch, C. & J. Kast, (2010) Optimization of Formaldehyde Cross-Linking for Protein Interaction Analysis of Non-Tagged Integrin *BioMed Research International* **2010**.
- Korndörfer, I.P., M.K. Dommel & A. Skerra, (2004) Structure of the periplasmic chaperone Skp suggests functional similarity with cytosolic chaperones despite differing architecture. *Nature structural & molecular biology* **11**: 1015-1020.

- Kosk-Kosicka, D. & T. Bzdega, (1988) Activation of the erythrocyte Ca²⁺-ATPase by either self-association or interaction with calmodulin. *Journal of Biological Chemistry* **263**: 18184-18189.
- Kosk-Kosicka, D., T. Bzdega & A. Wawrzynow, (1989) Fluorescence energy transfer studies of purified erythrocyte Ca²⁺-ATPase. Ca²⁺-regulated activation by oligomerization. *Journal of Biological Chemistry* **264**: 19495-19499.
- Kozak, N.A., M. Buss, C.E. Lucas, M. Frace, D. Govil, T. Travis, M. Olsen-Rasmussen, R.F. Benson & B.S. Fields, (2010) Virulence factors encoded by *Legionella longbeachae* identified on the basis of the genome sequence analysis of clinical isolate D-4968. *Journal of bacteriology* **192**: 1030-1044.
- Krinos, C., A. High & F. Rodgers, (1999) Role of the 25 kDa major outer membrane protein of *Legionella pneumophila* in attachment to U-937 cells and its potential as a virulence factor for chick embryos. *Journal of applied microbiology* **86**: 237-244.
- Ku, B., K.-H. Lee, W.S. Park, C.-S. Yang, J. Ge, S.-G. Lee, S.-S. Cha, F. Shao, W. Do Heo & J.U. Jung, (2012) VipD of *Legionella pneumophila* targets activated Rab5 and Rab22 to interfere with endosomal trafficking in macrophages. *PLoS pathogens* **8**: e1003082-e1003082.
- Kubori, T., A. Hyakutake & H. Nagai, (2008) *Legionella* translocates an E3 ubiquitin ligase that has multiple U-boxes with distinct functions. *Molecular microbiology* **67**: 1307-1319.
- Kuhle, K. & A. Flieger, (2014) *Legionella* Phospholipases Implicated in Virulence. In: *Molecular Mechanisms in Legionella Pathogenesis*. Springer, pp. 175-209.
- Kuwahara, K., C. Angkawidjaja, Y. Koga, K. Takano & S. Kanaya, (2011) Importance of an extreme C-terminal motif of a family I. 3 lipase for stability. *Protein Engineering Design and Selection* **24**: 411-418.
- Kuykendall, L., M. Roy, J. O'Neill & T. Devine, (1988) Fatty acids, antibiotic resistance, and deoxyribonucleic acid homology groups of *Bradyrhizobium japonicum*. *International journal of systematic bacteriology* **38**: 358-361.
- Laemmli, U.K., (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature* **227**: 680-685.
- Lammertyn, E., L. Van Mellaert, E. Meyen, I. Lebeau, E. De Buck, J. Anné & N. Geukens, (2004) Molecular and functional characterization of type I signal peptidase from *Legionella pneumophila*. *Microbiology* **150**: 1475-1483.
- Lang, C. & A. Flieger, (2011) Characterisation of *Legionella pneumophila* phospholipases and their impact on host cells. *European journal of cell biology* **90**: 903-912.
- Lang, C., E. Rastew, B. Hermes, E. Siegbrecht, R. Ahrends, S. Banerji & A. Flieger, (2012) Zinc metalloproteinase ProA directly activates *Legionella pneumophila* PlaC glycerophospholipid: cholesterol acyltransferase. *Journal of Biological Chemistry* **287**: 23464-23478.
- Lau, H. & N. Ashbolt, (2009) The role of biofilms and protozoa in *Legionella* pathogenesis: implications for drinking water. *Journal of applied microbiology* **107**: 368-378.
- Laue, M.T., B. D. Shah, T. M. Rigdeway and S. L. Pelletier (1992) Computer-Aided Interpretation of Analytical Sedimentation Data For Proteins. *Analytical Ultracentrifugation in Biochemistry and Polymer Science Cambridge, UK*: 90-125: 90-125

- Lebowitz, J., M.S. Lewis & P. Schuck, (2002) Modern analytical ultracentrifugation in protein science: a tutorial review. *Protein Science* **11**: 2067-2079.
- Levin, A.S., (2009) Nosocomial legionellosis: prevention and management.
- Lichty, J.J., J.L. Malecki, H.D. Agnew, D.J. Michelson-Horowitz & S. Tan, (2005) Comparison of affinity tags for protein purification. *Protein expression and purification* **41**: 98-105.
- Lifshitz, Z., D. Burstein, M. Peeri, T. Zusman, K. Schwartz, H.A. Shuman, T. Pupko & G. Segal, (2013) Computational modeling and experimental validation of the Legionella and Coxiella virulence-related type-IVB secretion signal. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**: E707-E715.
- Lin, M.-E., D.R. Herr & J. Chun, (2010) Lysophosphatidic acid (LPA) receptors: signaling properties and disease relevance. *Prostaglandins & other lipid mediators* **91**: 130-138.
- Linkous, A. & E. Yazlovitskaya, (2010) Cytosolic phospholipase A2 as a mediator of disease pathogenesis. *Cellular microbiology* **12**: 1369-1377.
- Lossi, N.S., N. Rolhion, A.I. Magee, C. Boyle & D.W. Holden, (2008) The Salmonella SPI-2 effector SseJ exhibits eukaryotic activator-dependent phospholipase A and glycerophospholipid: cholesterol acyltransferase activity. *Microbiology* **154**: 2680-2688.
- Lück, C., (2011) Legionella pneumophila. *Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz* **54**: 693-698.
- Lück, P. & M. Steinert, (2006) Pathogenese, Diagnostik und Therapie der Legionella-Infektion. *Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz* **49**: 439-449.
- Lück, P.C., E. Jacobs, I. Röske, U. Schröter-Bobsin, R. Dumke & S. Gronow, (2010) Legionella dresdenensis sp. nov., isolated from river water. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **60**: 2557-2562.
- Luo, Z.-Q. & R.R. Isberg, (2004) Multiple substrates of the Legionella pneumophila Dot/Icm system identified by interbacterial protein transfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 841-846.
- Magro, A.J., A.M. Soares, J.R. Giglio & M.R. Fontes, (2003) Crystal structures of BnSP-7 and BnSP-6, two Lys49-phospholipases A2: quaternary structure and inhibition mechanism insights. *Biochemical and biophysical research communications* **311**: 713-720.
- Mansfeld, J. & R. Ulbrich-Hofmann, (2007) Secretory phospholipase A2- α from Arabidopsis thaliana: functional parameters and substrate preference. *Chemistry and physics of lipids* **150**: 156-166.
- Marchi-Salvador, D.P., L.C. Corrêa, A.J. Magro, C.Z. Oliveira, A.M. Soares & M.R. Fontes, (2008) Insights into the role of oligomeric state on the biological activities of crotoxin: crystal structure of a tetrameric phospholipase A2 formed by two isoforms of crotoxin B from Crotalus durissus terrificus venom. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **72**: 883-891.
- Masamune, A., Y. Sakai, A. Satoh, M. Fujita, M. Yoshida & T. Shimosegawa, (2001) Lysophosphatidylcholine induces apoptosis in AR42J cells. *Pancreas* **22**: 75-83.

- Mason, R.J. & M.C. Williams, (1980) Phospholipid composition and ultrastructure of A549 cells and other cultured pulmonary epithelial cells of presumed type II cell origin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism* **617**: 36-50.
- Matthews, M. & C.R. Roy, (2000) Identification and subcellular localization of the Legionella pneumophila IcmX protein: a factor essential for establishment of a replicative organelle in eukaryotic host cells. *Infection and immunity* **68**: 3971-3982.
- McCoy-Simandle, K., C.R. Stewart, J. Dao, S. DebRoy, O. Rossier, P.J. Bryce & N.P. Cianciotto, (2011) Legionella pneumophila type II secretion dampens the cytokine response of infected macrophages and epithelia. *Infection and immunity* **79**: 1984-1997.
- McDade, J.E., D.J. Brenner & F.M. Bozeman, (1979) Legionnaires' disease bacterium isolated in 1947. *Annals of Internal Medicine* **90**: 659-661.
- McDade, J.E., C.C. Shepard, D.W. Fraser, T.R. Tsai, M.A. Redus & W.R. Dowdle, (1977) Legionnaires' disease: isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease. *New England Journal of Medicine* **297**: 1197-1203.
- McMorran, B., L. Town, E. Costelloe, J. Palmer, J. Engel, D. Hume & B. Wainwright, (2003) Effector ExoU from the type III secretion system is an important modulator of gene expression in lung epithelial cells in response to Pseudomonas aeruginosa infection. *Infection and immunity* **71**: 6035-6044.
- Mertens, H.D. & D.I. Svergun, (2010) Structural characterization of proteins and complexes using small-angle X-ray solution scattering. *Journal of structural biology* **172**: 128-141.
- Merzbacher, M., C. Detsch, W. Hillen & J. Stülke, (2004) Mycoplasma pneumoniae HPr kinase/phosphorylase. *European Journal of Biochemistry* **271**: 367-374.
- Messaoudi, A., H. Belguith, I. Ghram & J. Ben Hamida, (2010) Classification of EC 3.1. 1.3 bacterial true lipases using phylogenetic analysis. *African Journal of Biotechnology* **9**: 8243-8247.
- Miller, L.T., (1982) Single derivatization method for routine analysis of bacterial whole-cell fatty acid methyl esters, including hydroxy acids. *Journal of Clinical Microbiology* **16**: 584-586.
- Mølgaard, A., S. Kauppinen & S. Larsen, (2000) Rhamnogalacturonan acetyltransferase elucidates the structure and function of a new family of hydrolases. *Structure* **8**: 373-383.
- Moliner, C., D. Raoult & P.-E. Fournier, (2009) Evidence that the intra-amoebal Legionella drancourtii acquired a sterol reductase gene from eukaryotes. *BMC research notes* **2**: 51.
- Molmeret, M., R. Asare, R.A. Carabeo & Y.A. Kwaik, (2007) Rapid escape of the dot/icm mutants of Legionella pneumophila into the cytosol of mammalian and protozoan cells. *Infection and immunity* **75**: 3290-3304.
- Molofsky, A., L. Shetron-Rama & M.S. Swanson, (2005) Components of the Legionella pneumophila flagellar regulon contribute to multiple virulence traits, including lysosome avoidance and macrophage death. *Infection and immunity* **73**: 5720-5734.
- Molofsky, A.B. & M.S. Swanson, (2004) Differentiate to thrive: lessons from the Legionella pneumophila life cycle. *Molecular microbiology* **53**: 29-40.
- Moolenaar, W.H., L.A. van Meeteren & B.N. Giepmans, (2004) The ins and outs of lysophosphatidic acid signaling. *Bioessays* **26**: 870-881.

- Muder, R.R. & L.Y. Victor, (2002) Infection due to *Legionella* species other than *L. pneumophila*. *Clinical infectious diseases* **35**: 990-998.
- Muder, R.R., V.L. Yu & A.H. Woo, (1986) Mode of transmission of *Legionella pneumophila*: a critical review. *Archives of internal medicine* **146**: 1607.
- Murugesan, G., M. Sandhya Rani, C.E. Gerber, C. Mukhopadhyay, R.M. Ransohoff, G.M. Chisolm & K. Kottke-Marchant, (2003) Lysophosphatidylcholine regulates human microvascular endothelial cell expression of chemokines. *Journal of molecular and cellular cardiology* **35**: 1375-1384.
- Nagai, H., E.D. Cambronne, J.C. Kagan, J.C. Amor, R.A. Kahn & C.R. Roy, (2005) A C-terminal translocation signal required for Dot/Icm-dependent delivery of the *Legionella* RalF protein to host cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 826-831.
- Nakano, N., T. Kubori, M. Kinoshita, K. Imada & H. Nagai, (2010) Crystal structure of *Legionella* DotD: insights into the relationship between type IVB and type II/III secretion systems. *PLoS pathogens* **6**: e1001129.
- Nallamsetty, S. & D.S. Waugh, (2006) Solubility-enhancing proteins MBP and NusA play a passive role in the folding of their fusion partners. *Protein expression and purification* **45**: 175-182.
- Newton, H.J., D.K. Ang, I.R. van Driel & E.L. Hartland, (2010) Molecular pathogenesis of infections caused by *Legionella pneumophila*. *Clinical microbiology reviews* **23**: 274-298.
- Nishihara, K., M. Kanemori, H. Yanagi & T. Yura, (2000) Overexpression of trigger factor prevents aggregation of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology* **66**: 884-889.
- Nora, T., M. Lomma, L. Gomez-Valero & C. Buchrieser, (2009) Molecular mimicry: an important virulence strategy employed by *Legionella pneumophila* to subvert host functions. *Future microbiology* **4**: 691-701.
- Oliva, J.L., J.L. Oliva, E.M. Griner, J.L. Oliva, E.M. Griner & M.G. Kazanietz, (2005) PKC isozymes and diacylglycerol-regulated proteins as effectors of growth factor receptors. *Growth Factors* **23**: 245-252.
- Omori, K., A. Idei & H. Akatsuka, (2001) *Serratia* ATP-binding cassette protein exporter, Lip, recognizes a protein region upstream of the C terminus for specific secretion. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 27111-27119.
- Papageorgiou, A.C., S. Hermawan, C.B. Singh & D. Jendrossek, (2008) Structural Basis of Poly (3-Hydroxybutyrate) Hydrolysis by PhaZ7 Depolymerase from *Paucimonas lemoignei*. *Journal of molecular biology* **382**: 1184-1194.
- Payne, N.R. & M.A. Horwitz, (1987) Phagocytosis of *Legionella pneumophila* is mediated by human monocyte complement receptors. *The Journal of experimental medicine* **166**: 1377-1389.
- Peabody, C.R., Y.J. Chung, M.-R. Yen, D. Vidal-Ingigliardi, A.P. Pugsley & M.H. Saier, (2003) Type II protein secretion and its relationship to bacterial type IV pili and archaeal flagella. *Microbiology* **149**: 3051-3072.

- Pearce, M.M., N. Theodoropoulos, M.J. Mandel, E. Brown, K.D. Reed & N.P. Cianciotto, (2012) *Legionella cardiaca* sp. nov., isolated from a case of native valve endocarditis in a human heart. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **62**: 2946-2954.
- Petoukhov, M.V., D. Franke, A.V. Shkumatov, G. Tria, A.G. Kikhney, M. Gajda, C. Gorba, H.D. Mertens, P.V. Konarev & D.I. Svergun, (2012) New developments in the ATSAS program package for small-angle scattering data analysis. *Journal of Applied Crystallography* **45**: 342-350.
- Phillips, R.M., D.A. Six, E.A. Dennis & P. Ghosh, (2003) In vivo phospholipase activity of the *Pseudomonas aeruginosa* cytotoxin ExoU and protection of mammalian cells with phospholipase A2 inhibitors. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 41326-41332.
- Popoff, M.R. & P. Bouvet, (2009) Clostridial toxins. *Future microbiology* **4**: 1021-1064.
- Postle, A.D., E.L. Heeley & D.C. Wilton, (2001) A comparison of the molecular species compositions of mammalian lung surfactant phospholipids. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* **129**: 65-73.
- Prokazova, N., N. Zvezdina & A. Korotaeva, (1998) Review: effect of lysophosphatidylcholine on transmembrane signal transduction. *Biochem (Mosc)* **63**: 31-37.
- Qiu, J. & Z.-Q. Luo, (2014) Effector Translocation by the Legionella Dot/Icm Type IV Secretion System. In: *Molecular Mechanisms in Legionella Pathogenesis*. Springer, pp. 103-115.
- Raederstorff, D. & M. Rohmer, (1985) Sterol biosynthesis de nova via cycloartenol by the soil amoeba *Acanthamoeba polyphaga*. *Biochem. J* **231**: 609-615.
- Ramrakhiani, L. & S. Chand, (2011) Recent progress on phospholipases: different sources, assay methods, industrial potential and pathogenicity. *Applied biochemistry and biotechnology* **164**: 991-1022.
- Rasila, T.S., M.I. Pajunen & H. Savilahti, (2009) Critical evaluation of random mutagenesis by error-prone polymerase chain reaction protocols, *Escherichia coli* mutator strain, and hydroxylamine treatment. *Analytical biochemistry* **388**: 71-80.
- Reeves, M., L. Pine, S. Hutner, J. George & W. Harrell, (1981) Metal requirements of *Legionella pneumophila*. *Journal of clinical microbiology* **13**: 688-695.
- Ropp, P.A. & T.W. Traut, (1991) Purine nucleoside phosphorylase. Allosteric regulation of a dissociating enzyme. *Journal of Biological Chemistry* **266**: 7682-7687.
- Rossier, O. & N.P. Cianciotto, (2001) Type II Protein Secretion Is a Subset of the PilD-Dependent Processes That Facilitate Intracellular Infection by *Legionella pneumophila*. *Infection and immunity* **69**: 2092-2098.
- Rossier, O. & N.P. Cianciotto, (2005) The *Legionella pneumophila* tatB gene facilitates secretion of phospholipase C, growth under iron-limiting conditions, and intracellular infection. *Infection and immunity* **73**: 2020-2032.
- Rossier, O., J. Dao & N.P. Cianciotto, (2008) The type II secretion system of *Legionella pneumophila* elaborates two aminopeptidases, as well as a metalloprotease that contributes to differential infection among protozoan hosts. *Applied and environmental microbiology* **74**: 753-761.

- Rossier, O., J. Dao & N.P. Cianciotto, (2009) A type II secreted RNase of *Legionella pneumophila* facilitates optimal intracellular infection of *Hartmannella vermiformis*. *Microbiology* **155**: 882-890.
- Rossier, O., S.R. Starkenburg & N.P. Cianciotto, (2004) *Legionella pneumophila* type II protein secretion promotes virulence in the A/J mouse model of Legionnaires' disease pneumonia. *Infection and immunity* **72**: 310-321.
- Rowbotham, T.J., (1980) Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. *Journal of Clinical Pathology* **33**: 1179-1183.
- Roy, C.R., K.H. Berger & R.R. Isberg, (1998) *Legionella pneumophila* DotA protein is required for early phagosome trafficking decisions that occur within minutes of bacterial uptake. *Molecular microbiology* **28**: 663-674.
- Roy, C.R. & R.R. Isberg, (1997) Topology of *Legionella pneumophila* DotA: an inner membrane protein required for replication in macrophages. *Infection and immunity* **65**: 571-578.
- Ruiz-Albert, J., X.J. Yu, C.R. Beuzón, A.N. Blakey, E.E. Galyov & D.W. Holden, (2002) Complementary activities of SseJ and SifA regulate dynamics of the *Salmonella typhimurium* vacuolar membrane. *Molecular microbiology* **44**: 645-661.
- Rydel, T.J., J.M. Williams, E. Krieger, F. Moshiri, W.C. Stallings, S.M. Brown, J.C. Pershing, J.P. Purcell & M.F. Alibhai, (2003) The crystal structure, mutagenesis, and activity studies reveal that patatin is a lipid acyl hydrolase with a Ser-Asp catalytic dyad. *Biochemistry* **42**: 6696-6708.
- Sadosky, A.B., L.A. Wiater & H.A. Shuman, (1993) Identification of *Legionella pneumophila* genes required for growth within and killing of human macrophages. *Infection and Immunity* **61**: 5361-5373.
- Salacha, R., F. Kovačić, C. Brochier-Armanet, S. Wilhelm, J. Tommassen, A. Filloux, R. Voulhoux & S. Bleves, (2010) The *Pseudomonas aeruginosa* patatin-like protein PlpD is the archetype of a novel Type V secretion system. *Environmental microbiology* **12**: 1498-1512.
- Saliba, A., D. Nascimento, M. Silva, M. Assis, C. Gayer, B. Raymond, M. Coelho, E. Marques, L. Touqui & R. Albano, (2005) Eicosanoid-mediated proinflammatory activity of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU. *Cellular microbiology* **7**: 1811-1822.
- Saliba, A.M., M.-C. De Assis, R. Nishi, B. Raymond, E.d.A. Marques, U.G. Lopes, L. Touqui & M.-C. Plotkowski, (2006) Implications of oxidative stress in the cytotoxicity of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU. *Microbes and infection* **8**: 450-459.
- Sambrook, J. & D. Russell, (2001) Molecular cloning: a laboratory manual (2001) 3rd. Plainview (New York: Cold Spring Harbor Laboratories).
- Sanchez, S.A., Y. Chen, J.D. Müller, E. Gratton & T.L. Hazlett, (2001) Solution and interface aggregation states of *Crotalus atrox* venom phospholipase A2 by two-photon excitation fluorescence correlation spectroscopy. *Biochemistry* **40**: 6903-6911.
- Sanger, F., S. Nicklen & A.R. Coulson, (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **74**: 5463-5467.

- Sankaran, K. & H.C. Wu, (1994) Lipid modification of bacterial prolipoprotein. Transfer of diacylglycerol moiety from phosphatidylglycerol. *Journal of Biological Chemistry* **269**: 19701-19706.
- Sato, H. & D.W. Frank, (2004) ExoU is a potent intracellular phospholipase. *Molecular microbiology* **53**: 1279-1290.
- Sato, H., D.W. Frank, C.J. Hillard, J.B. Feix, R.R. Pankhaniya, K. Moriyama, V. Finck-Barbançon, A. Buchaklian, M. Lei & R.M. Long, (2003) The mechanism of action of the *Pseudomonas aeruginosa*-encoded type III cytotoxin, ExoU. *The EMBO journal* **22**: 2959-2969.
- Schmidt, T.G. & A. Skerra, (2007) The Strep-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins. *Nature protocols* **2**: 1528-1535.
- Schmiel, D.H. & V.L. Miller, (1999) Bacterial phospholipases and pathogenesis. *Microbes and infection* **1**: 1103-1112.
- Schrag, J.D. & M. Cygler, (1996) Lipases and alpha/beta hydrolase fold. *Methods in enzymology* **284**: 85-107.
- Schroeder, G.N., N.K. Petty, A. Mousnier, C.R. Harding, A.J. Vogrin, B. Wee, N.K. Fry, T.G. Harrison, H.J. Newton & N.R. Thomson, (2010) *Legionella pneumophila* strain 130b possesses a unique combination of type IV secretion systems and novel Dot/Icm secretion system effector proteins. *Journal of bacteriology* **192**: 6001-6016.
- Schuck, P., (2000) Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and lamm equation modeling. *Biophysical journal* **78**: 1606-1619.
- Schunder, E., (2010*) Untersuchungen zur Funktion und Lokalisation der Phospholipase A/Lysophospholipase A (PlaB) von *Legionella pneumophila*. Dissertation
- Schunder, E., P. Adam, F. Higa, K.A. Remer, U. Lorenz, J. Bender, T. Schulz, A. Flieger, M. Steinert & K. Heuner, (2010) Phospholipase PlaB is a new virulence factor of *Legionella pneumophila*. *International Journal of Medical Microbiology* **300**: 313-323.
- Scott, D.L. & P.B. Sigler, (1994) Structure and catalytic mechanism of secretory phospholipases A 2. *Advances in protein chemistry* **45**: 53-89.
- Segal, G., M. Purcell & H.A. Shuman, (1998) Host cell killing and bacterial conjugation require overlapping sets of genes within a 22-kb region of the *Legionella pneumophila* genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**: 1669-1674.
- Segal, G., J.J. Russo & H.A. Shuman, (1999) Relationships between a new type IV secretion system and the icm/dot virulence system of *Legionella pneumophila*. *Molecular microbiology* **34**: 799-809.
- Segal, G. & H.A. Shuman, (1999*) *Legionella pneumophila* utilizes the same genes to multiply within *Acanthamoeba castellanii* and human macrophages. *Infection and immunity* **67**: 2117-2124.
- Seipel, K. & A. Flieger, (2013) *Legionella* Phospholipases Implicated in Infection: Determination of Enzymatic Activities. In: *Legionella*. Springer, pp. 355-365.
- Shewry, P.R., (2003) Tuber storage proteins. *Annals of Botany* **91**: 755-769.

- Shi, X., C. Shao, X. Zhang, C. Zambonelli, A.G. Redfield, J.F. Head, B.A. Seaton & M.F. Roberts, (2009) Modulation of *Bacillus thuringiensis* phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity by mutations in the putative dimerization interface. *Journal of Biological Chemistry* **284**: 15607-15618.
- Shinoda, S., H. Matsuoka, T. Tsuchie, S.-I. Miyoshi, S. Yamamoto, H. Taniguchi & Y. Mizuguchi, (1991) Purification and characterization of a lecithin-dependent haemolysin from *Escherichia coli* transformed by a *Vibrio parahaemolyticus* gene. *Journal of general microbiology* **137**: 2705-2711.
- Shohdy, N., J.A. Efe, S.D. Emr & H.A. Shuman, (2005) Pathogen effector protein screening in yeast identifies *Legionella* factors that interfere with membrane trafficking. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 4866-4871.
- Silveira, T.N. & D.S. Zamboni, (2010) Pore formation triggered by *Legionella* spp. is an Nlr4 inflammasome-dependent host cell response that precedes pyroptosis. *Infection and immunity* **78**: 1403-1413.
- Singer, S.J. & G.L. Nicolson, (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175**: 720-731.
- Singh, G., G. Singh, D. Jadeja & J. Kaur, (2010) Lipid hydrolyzing enzymes in virulence: *Mycobacterium tuberculosis* as a model system. *Critical reviews in microbiology* **36**: 259-269.
- Sitkiewicz, I., K.E. Stockbauer & J.M. Musser, (2007) Secreted bacterial phospholipase A2 enzymes: better living through phospholipolysis. *Trends in microbiology* **15**: 63-69.
- Snijder, H. & B. Dijkstra, (2000) Bacterial phospholipase A: structure and function of an integral membrane phospholipase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids* **1488**: 91-101.
- Snijder, H., I. Ubarretxena-Belandia, M. Blaauw, K. Kalk, H. Verheij, M. Egmond, N. Dekker & B. Dijkstra, (1999) Structural evidence for dimerization-regulated activation of an integral membrane phospholipase. *Nature* **401**: 717-721.
- Songer, J.G., (1997) Bacterial phospholipases and their role in virulence. *Trends in microbiology* **5**: 156-161.
- Sreenivas, A., J.L. Patton-Vogt, V. Bruno, P. Griac & S.A. Henry, (1998) A role for phospholipase D (Pld1p) in growth, secretion, and regulation of membrane lipid synthesis in yeast. *Journal of Biological Chemistry* **273**: 16635-16638.
- Steinert, M., U. Hentschel & J. Hacker, (2002) *Legionella pneumophila*: an aquatic microbe goes astray. *FEMS microbiology reviews* **26**: 149-162.
- Steinert, M., K. Heuner, C. Buchrieser, C. Albert-Weissenberger & G. Glöckner, (2007) *Legionella* pathogenicity: Genome structure, regulatory networks and the host cell response. *International Journal of Medical Microbiology* **297**: 577-587.
- Stone, B.J. & Y.A. Kwaik, (1998) Expression of multiple pili by *Legionella pneumophila*: identification and characterization of a type IV pilin gene and its role in adherence to mammalian and protozoan cells. *Infection and immunity* **66**: 1768-1775.
- Stout, J.E. & V.L. Yu, (1997) Legionellosis. *New England Journal of Medicine* **337**: 682-687.

- Sturgill-Koszycki, S. & M.S. Swanson, (2000) Legionella pneumophila replication vacuoles mature into acidic, endocytic organelles. *The Journal of experimental medicine* **192**: 1261-1272.
- Susa, M., J. Hacker & R. Marre, (1996) De novo synthesis of Legionella pneumophila antigens during intracellular growth in phagocytic cells. *Infection and immunity* **64**: 1679-1684.
- Sutherland, M.C., T.L. Nguyen, V. Tseng & J.P. Vogel, (2012) The Legionella IcmSW complex directly interacts with DotL to mediate translocation of adaptor-dependent substrates. *PLoS pathogens* **8**: e1002910.
- Sutterwala, F.S., L.A. Mijares, L. Li, Y. Ogura, B.I. Kazmierczak & R.A. Flavell, (2007) Immune recognition of Pseudomonas aeruginosa mediated by the IPAF/NLRC4 inflammasome. *The Journal of experimental medicine* **204**: 3235-3245.
- Svergun, D., (1999) Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing. *Biophysical journal* **76**: 2879-2886.
- Svergun, D.I., M.V. Petoukhov & M.H. Koch, (2001) Determination of domain structure of proteins from X-ray solution scattering. *Biophysical journal* **80**: 2946-2953.
- Swanson, M. & B. Hammer, (2000) Legionella pneumophila pathogenesis: a fateful journey from amoebae to macrophages. *Annual Reviews in Microbiology* **54**: 567-613.
- Takahashi, M., H. Okazaki, Y. Ogata, K. Takeuchi, U. Ikeda & K. Shimada, (2002) Lysophosphatidylcholine induces apoptosis in human endothelial cells through a p38-mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism. *Atherosclerosis* **161**: 387-394.
- Takeshita, S., N. Inoue, D. Gao, Y. Rikitake, S. Kawashima, R. Tawa, H. Sakurai & M. Yokoyama, (1999) Lysophosphatidylcholine enhances superoxide anions production via endothelial NADH/NADPH oxidase. *Journal of atherosclerosis and thrombosis* **7**: 238-246.
- Tamura, M., T. Ajayi, L.R. Allmond, K. Moriyama, J.P. Wiener-Kronish & T. Sawa, (2004) Lysophospholipase A activity of Pseudomonas aeruginosa type III secretory toxin ExoU. *Biochemical and biophysical research communications* **316**: 323-331.
- Taylor, M., K. Ross & R. Bentham, (2009) Legionella, protozoa, and biofilms: interactions within complex microbial systems. *Microbial ecology* **58**: 538-547.
- Thomas, J.G., A. Ayling & F. Baneyx, (1997) Molecular chaperones, folding catalysts, and the recovery of active recombinant proteins from E. coli. *Applied biochemistry and biotechnology* **66**: 197-238.
- Tilney, L.G., O.S. Harb, P.S. Connelly, C.G. Robinson & C.R. Roy, (2001) How the parasitic bacterium Legionella pneumophila modifies its phagosome and transforms it into rough ER: implications for conversion of plasma membrane to the ER membrane. *Journal of Cell Science* **114**: 4637-4650.
- Tindall, B., J. Sikorski, R. Smibert & N. Krieg, (2007) Phenotypic characterization and the principles of comparative systematics. *Methods for general and molecular microbiology* **3**: 330-393.
- Titball, R., (1998) Bacterial phospholipases. *Journal of Applied Microbiology* **84**: 127S-137S.
- Titball, R.W., (1993) Bacterial phospholipases C. *Microbiological Reviews* **57**: 347-366.

- Traut, T.W., (1994) Dissociation of enzyme oligomers: a mechanism for allosteric regulation. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* **29**: 125-163.
- Upton, C. & J.T. Buckley, (1995) A new family of lipolytic enzymes? *Trends in biochemical sciences* **20**: 178-179.
- van der Meer-Janssen, Y.P., J. van Galen, J.J. Batenburg & J.B. Helms, (2010) Lipids in host-pathogen interactions: pathogens exploit the complexity of the host cell lipidome. *Progress in lipid research* **49**: 1-26.
- Van Itallie, C.M., L.L. Mitic & J.M. Anderson, (2011) Claudin-2 forms homodimers and is a component of a high molecular weight protein complex. *Journal of biological chemistry* **286**: 3442-3450.
- Van Kampen, M., J.-W. Simons, N. Dekker, M. Egmond & H. Verheij, (1998) The phospholipase activity of *Staphylococcus hyicus* lipase strongly depends on a single Ser to Val mutation. *Chemistry and physics of lipids* **93**: 39-45.
- van Kampen, M.D., R. Rosenstein, F. Götz & M.R. Egmond, (2001) Cloning, purification and characterisation of *Staphylococcus warneri* lipase 2. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology* **1544**: 229-241.
- van Leeuwen, F.N., C. Olivo, S. Grivell, B.N. Giepmans, J.G. Collard & W.H. Moolenaar, (2003) Rac Activation by Lysophosphatidic Acid LPA1 Receptors through the Guanine Nucleotide Exchange Factor Tiam1. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 400-406.
- Van Oort, M.G., A.M. Deveer, R. Dijkman, M.L. Tjeenk, H.M. Verheij, G.H. De Haas, E. Wenzig & F. Goetz, (1989) Purification and substrate specificity of *Staphylococcus hyicus* lipase. *Biochemistry* **28**: 9278-9285.
- VanRheenen, S.M., Z.-Q. Luo, T. O'Connor & R.R. Isberg, (2006) Members of a *Legionella pneumophila* family of proteins with ExoU (phospholipase A) active sites are translocated to target cells. *Infection and immunity* **74**: 3597-3606.
- Venkataraman, C., B.J. Haack, S. Bondada & Y.A. Kwaik, (1997) Identification of a Gal/GalNAc lectin in the protozoan *Hartmannella vermiformis* as a potential receptor for attachment and invasion by the Legionnaires' disease bacterium. *The Journal of experimental medicine* **186**: 537-547.
- Verdon, J., J.-M. Berjeaud, C. Lacombe & Y. Héchard, (2008) Characterization of anti-*Legionella* activity of warnericin RK and delta-lysin I from *Staphylococcus warneri*. *Peptides* **29**: 978-984.
- Verdon, J., J. Labanowski, T. Sahr, T. Ferreira, C. Lacombe, C. Buchrieser, J.-M. Berjeaud & Y. Héchard, (2011) Fatty acid composition modulates sensitivity of *Legionella pneumophila* to warnericin RK, an antimicrobial peptide. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **1808**: 1146-1153.
- Victor, L.Y., J.F. Plouffe, M.C. Pastoris, J.E. Stout, M. Schousboe, A. Widmer, J. Summersgill, T. File, C.M. Heath & D.L. Paterson, (2002) Distribution of *Legionella* species and serogroups isolated by culture in patients with sporadic community-acquired legionellosis: an international collaborative survey. *Journal of Infectious Diseases* **186**: 127-128.
- Victor, L.Y., J.J. Zuravleff, L. Gavlik & M.H. Magnussen, (1983) Lack of evidence for person-to-person transmission of Legionnaires' disease. *Journal of Infectious Diseases* **147**: 362-362.

- Vincent, C.D., J.R. Friedman, K.C. Jeong, E.C. Buford, J.L. Miller & J.P. Vogel, (2006) Identification of the core transmembrane complex of the Legionella Dot/Icm type IV secretion system. *Molecular microbiology* **62**: 1278-1291.
- Viner, R., D. Chetrit, M. Ehrlich & G. Segal, (2012) Identification of two Legionella pneumophila effectors that manipulate host phospholipids biosynthesis. *PLoS pathogens* **8**: e1002988.
- Virtanen, J.A., K.H. Cheng & P. Somerharju, (1998) Phospholipid composition of the mammalian red cell membrane can be rationalized by a superlattice model. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**: 4964-4969.
- Vogel, J.P., H.L. Andrews, S.K. Wong & R.R. Isberg, (1998) Conjugative transfer by the virulence system of Legionella pneumophila. *Science* **279**: 873-876.
- Volkman, J., (2003) Sterols in microorganisms. *Applied microbiology and Biotechnology* **60**: 495-506.
- Vranckx, L., E. De Buck, J. Anné & E. Lammertyn, (2007) Legionella pneumophila exhibits plasminogen activator activity. *Microbiology* **153**: 3757-3765.
- Wagner, C., A.S. Khan, T. Kamphausen, B. Schmausser, C. Ünal, U. Lorenz, G. Fischer, J. Hacker & M. Steinert, (2007) Collagen binding protein Mip enables Legionella pneumophila to transmigrate through a barrier of NCI-H292 lung epithelial cells and extracellular matrix. *Cellular microbiology* **9**: 450-462.
- Wall, J.G. & A. Plückthun, (1995) Effects of overexpressing folding modulators on the in vivo folding of heterologous proteins in Escherichia coli. *Current Opinion in Biotechnology* **6**: 507-516.
- Watanabe, K., Y. Hata, H. Kizaki, Y. Katsube & Y. Suzuki, (1997) The refined crystal structure of Bacillus cereus oligo-1, 6-glucosidase at 2.0 Å resolution: structural characterization of proline-substitution sites for protein thermostabilization. *Journal of molecular biology* **269**: 142-153.
- Weissenmayer, B.A., J.G. Prendergast, A.J. Lohan & B.J. Loftus, (2011) Sequencing illustrates the transcriptional response of Legionella pneumophila during infection and identifies seventy novel small non-coding RNAs. *PLoS One* **6**: e17570.
- Weltzien, H.U., (1979) Cytolytic and membrane-perturbing properties of lysophosphatidylcholine. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes* **559**: 259-287.
- Wiater, L.A., K. Dunn, F.R. Maxfield & H.A. Shuman, (1998) Early events in phagosome establishment are required for intracellular survival of Legionella pneumophila. *Infection and immunity* **66**: 4450-4460.
- Wieland, H., F. Goetz & B. Neumeister, (2004) Phagosomal acidification is not a prerequisite for intracellular multiplication of Legionella pneumophila in human monocytes. *Journal of Infectious Diseases* **189**: 1610-1614.
- Winn Jr, W.C. & R.L. Myerowitz, (1981) The pathology of the Legionella pneumonias: a review of 74 cases and the literature. *Human pathology* **12**: 401-422.
- Wintermeyer, E., B. Ludwig, M. Steinert, B. Schmidt, G. Fischer & J. Hacker, (1995) Influence of site specifically altered Mip proteins on intracellular survival of Legionella pneumophila in eukaryotic cells. *Infection and immunity* **63**: 4576-4583.

- Wong, H., R.C. Davis, J. Nikazy, K.E. Seebart & M.C. Schotz, (1991) Domain exchange: characterization of a chimeric lipase of hepatic lipase and lipoprotein lipase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **88**: 11290-11294.
- Wyszomirski, K.H., U. Curth, J. Alves, P. Mackeldanz, E. Möncke-Buchner, M. Schutkowski, D.H. Krüger & M. Reuter, (2012) Type III restriction endonuclease EcoP15I is a heterotrimeric complex containing one Res subunit with several DNA-binding regions and ATPase activity. *Nucleic acids research* **40**: 3610-3622.
- Yang, G., R.F. Benson, R.M. Ratcliff, E.W. Brown, A.G. Steigerwalt, W.L. Thacker, M.I. Daneshvar, R.E. Morey, A. Saito & B.S. Fields, (2012) *Legionella nagasakiensis* sp. nov., isolated from water samples and from a patient with pneumonia. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **62**: 284-288.
- Yerushalmi, G., T. Zusman & G. Segal, (2005) Additive effect on intracellular growth by *Legionella pneumophila* Icm/Dot proteins containing a lipobox motif. *Infection and immunity* **73**: 7578-7587.
- Zhao, Y. & V. Natarajan, (2013) Lysophosphatidic acid (LPA) and its receptors: Role in airway inflammation and remodeling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids* **1831**: 86-92.
- Zhou, H.-X., G. Rivas & A.P. Minton, (2008) Macromolecular crowding and confinement: biochemical, biophysical, and potential physiological consequences. *Annual review of biophysics* **37**: 375.
- Zhou, Y.-L., J.-M. Liao, J. Chen & Y. Liang, (2006) Macromolecular crowding enhances the binding of superoxide dismutase to xanthine oxidase: implications for protein-protein interactions in intracellular environments. *The international journal of biochemistry & cell biology* **38**: 1986-1994.
- Zhu, W., S. Banga, Y. Tan, C. Zheng, R. Stephenson, J. Gately & Z.-Q. Luo, (2011) Comprehensive identification of protein substrates of the Dot/Icm type IV transporter of *Legionella pneumophila*. *PloS one* **6**: e17638.
- Zusman, T., O. Gal-Mor & G. Segal, (2002) Characterization of a *Legionella pneumophila* relA insertion mutant and roles of RelA and RpoS in virulence gene expression. *Journal of bacteriology* **184**: 67-75.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei allen Personen bedanken, die zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben.

Frau Prof. Dr. Antje Flieger gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des Themas, für ihre Unterstützung bei der Dissertation sowie für die umsichtige Betreuung.

Herrn Prof. Dr. Michael Steinert danke ich sehr für die unkomplizierte Übernahme des zweiten Gutachtens. Zudem bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. André Fleißner für die Übernahme des Vorsitzes der Prüfungskommission.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Gottfried Wilharm für seine Bereitschaft, mir mit Rat und Tat zur Seite zu stehen. Die aufschlussreichen Diskussionen und seine konstruktive Kritik haben meine Forschung sehr unterstützt.

Außerdem danke ich Herrn Dr. Jörn Krauß und Herrn Dr. Manfred Rössle für die strukturellen Analysen sowie Frau PD Dr. Ute Curth für die Analyse mittels analytischer Ultrazentrifugation der Phospholipase A PlaB. Ihre Hinweise und fachlichen Anregungen trugen zum Erfolg der Arbeit bei.

Herrn Dr. Brian J. Tindall möchte ich für die freundliche Übernahme der Analyse der Fettsäuren und polaren Lipide in *Legionella* sowie der hilfreichen fachlichen Gespräche danken. Dr. Manfred Nimtz und Beate Jaschok-Kentner danke ich für die massenspektrometrische bzw. Sequenzanalyse.

Ein ganz großes Dankeschön gilt den Kolleginnen und Kollegen, die mir die Zeit der Promotion am RKI in guter Erinnerung bleiben lassen. Insbesondere möchte ich mich bei Dr. Jennifer Bender, Dr. Christina Lang, Dr. Sven Halbedel, Maren Schlegel, Christine Heider, Dr. Kathleen Seipel, Dr. Katrin Jaschinski, Thomas Gerlach, Simone Dumschat, Susanne Karste, Christoph Eller, Karan Gautam Kaval, Jeanine Rismondo, Dr. Kevin Kurt, Ingolf Karl und Dr. Philipp Auraß für die gute Atmosphäre im Labor, die Hilfsbereitschaft und für die abendlichen Ablenkungen beim Sport, Grillen und Kochen bedanken.

Vielen Dank möchte ich auch den gewissenhaften und kritischen Korrekturlesern sagen.

Ganz besonders möchte ich meiner Familie und Nik danken, die mich immer auf meinem Weg unterstützt haben, mir bestärkend zur Seite standen und ein offenes Ohr für die Höhen und Tiefen meines Schaffens hatten.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Katja Kuhle
Geburtsdatum: 09.07.1980
Geburtsort: Halle/Saale
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: Deutsch

Schulbildung

1987 – 1991 Heinrich-Heine Oberschule in Halle (Saale)
1991 – 1999 Südstadt-Gymnasium in Halle (Saale)

Berufsausbildung

1999 – 2002 Ausbildung zur Pharmazeutisch-technischen Assistentin am Beruflichen Schulzentrum 9 Gesundheit und Sozialwesen der Stadt Leipzig

Akademische Ausbildung

2003 – 2008 Studium der Biochemie
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Abschluss: Diplom-Biochemikerin (*Note:* 1,0)
Schwerpunkte: Biochemie, Organische Chemie, Pflanzenphysiologie, Ökologische Biochemie

2008 Diplomarbeit (*Note:* 1,0)
Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie (IPB) in Halle
Abteilung für Stress- und Entwicklungsbiologie
bei Prof. Dr. Dierk Scheel und Dr. Justin Lee
Thema: „Die Charakterisierung potentieller MAPKinase-Interaktionsproteine aus *Arabidopsis thaliana*“

2010 - 2014 Promotion
Robert Koch-Institut (RKI) in Wernigerode
Fachgebiet für bakterielle darmpathogene Erreger und Legionellen
bei Prof. Dr. Antje Flieger (RKI)
Thema: „Charakterisierung der zellassoziierten Phospholipase A PlaB aus *Legionella pneumophila*, das erste beschriebene Mitglied einer neuen Lipasefamilie“

Publikationen

Kuhle, K. & Flieger, A. (2014). *Legionella* Phospholipases Implicated in Virulence. In *Molecular Mechanisms in Legionella Pathogenesis* (pp. 175-209). Springer Berlin, Heidelberg.

Kuhle, K., Krausze, J., Curth, U., Rössle, M., Heuner, K., Lang, C. & Flieger A. (2014): „Oligomerization inhibits *Legionella pneumophila* PlaB phospholipase A activity“. Journal of Biological Chemistry. 2014 May 8. pii: jbc.M114.573196.

Pecher, P., Eschen-Lippold, L., Herklotz, S., Kuhle, K., Naumann, K., Bethke, G., Uhrig, J., Weyhe, M., Scheel, D. & Lee, J. (2014). The *Arabidopsis thaliana* mitogen-activated protein kinases MPK3 and MPK6 target a subclass of ‘VQ-motif’-containing proteins to regulate immune responses. *New Phytologist*.